

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT



REC'D 18 DEC 1996

WIPO PCT

## Bescheinigung

Die BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH in Ingelheim am Rhein/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Tumorstoffe und Verfahren zu ihrer Herstellung"

am 24. Februar 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das Symbol A 61 K 48/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 22. November 1996

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Hiebinger

Aktenzeichen: 196 07 044.9

Case 14/033

DI Fa/dc

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH  
55216 Ingelheim am Rhein (BRD)

Tumorstoffe und Verfahren zu ihrer Herstellung

Die Erfindung bezieht sich auf Tumorkvakzine.

Die Entwicklung einer therapeutischen Vakzine auf der Grundlage von Tumorzellen beruht im wesentlichen auf den folgenden Voraussetzungen: es bestehen qualitative oder quantitative Unterschiede zwischen Tumorzellen und normalen Zellen; das Immunsystem hat prinzipiell die Fähigkeit, diese Unterschiede zu erkennen; das Immunsystem kann - durch aktive spezifische Immunisierung mit Vakzinen - dazu stimuliert werden, Tumorzellen anhand dieser Unterschiede zu erkennen und deren Abstoßung herbeizuführen.

Um eine Anti-Tumorkantwort herbeizuführen, müssen zumindest zwei Voraussetzungen erfüllt sein: erstens müssen die Tumorzellen Antigene oder Neoepitope, die auf normalen Zellen nicht vorkommen, exprimieren. Zweitens muß das Immunsystem entsprechend aktiviert werden, um auf diese Antigene zu reagieren. Ein wesentliches Hindernis bei der Immuntherapie von Tumoren ist deren geringe Immunogenizität, vor allem im Menschen. Dies ist insofern überraschend, als zu erwarten wäre, daß die große Anzahl genetischer Veränderungen maligner Zellen zur Entstehung von Peptid-Neoepitopen führen sollte, die im Kontext mit MHC-I-Molekülen von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden.

In jüngerer Zeit wurden Tumor-assoziierte und Tumor-spezifische Antigene entdeckt, die solche Neo-Epitope darstellen und somit potentielle Ziele für einen Angriff des Immunsystems darstellen sollten. Daß es dem Immunsystem dennoch nicht gelingt, Tumore zu eliminieren, die diese Neo-Epitope exprimieren, dürfte demnach offensichtlich nicht am Fehlen von Neo-Epitopen gelegen sein, sondern daran, daß die immunologische Antwort auf diese Neo-Antigene unzureichend ist.

Für die Immuntherapie von Krebs auf zellulärer Basis wurden zwei allgemeine Strategien entwickelt: Einerseits

die adoptive Immuntherapie, die sich der in vitro Expansion von tumorreaktiven T-Lymphozyten und deren Wiedereinführung in den Patienten bedient; andererseits die aktive Immuntherapie, welche Tumorzellen verwendet, in der Erwartung, daß damit entweder neue oder verstärkte Immunantworten gegen Tumorantigene hervorgerufen werden, die zu einer systemischen Tumorantwort führen.

Tumorstoffe auf der Grundlage der aktiven Immuntherapie wurden auf verschiedene Arten hergestellt; ein Beispiel dafür sind bestrahlte Tumorzellen, die mit immunstimulierenden Adjuvantien wie Corynebacterium parvum oder Bacillus Calmette Guerin (BCG) versetzt werden, um Immunreaktionen gegen Tumorantigene hervorzurufen (Oettgen und Old, 1991).

In den letzten Jahren wurden vor allem genetisch modifizierte Tumorzellen für eine aktive Immuntherapie gegen Krebs verwendet, wobei die in die Tumorzellen eingeführten Fremdgene in drei Kategorien fallen:

Eine davon verwendet Tumorzellen, die genetisch modifiziert werden, um Zytokine zu produzieren. Lokale Koinzidenz von Tumorzellen und Zytokinsignal sollen einen Stimulus setzen, der Anti-Tumorimmunität auslöst. Eine Übersicht über Anwendungen dieser Strategie wird von Pardoll, 1993, Zatloukal et al., 1993, und Dranoff und Mulligan, 1995, gegeben.

Von Tumorzellen, die genetisch verändert wurden, um Zytokine wie IL-2, GM-CSF oder IFN- $\gamma$  zu sekretieren oder um co-stimulierende Moleküle zu exprimieren, wurde in experimentellen Tiermodellen gezeigt, daß sie potente Anti-Tumorimmunität generieren (Dranoff et al., 1993; Zatloukal et al., 1995). Bei einem Menschen, der bereits eine beträchtliche Tumorbelastrung aufweist und eine Toleranz gegen den Tumor entwickelt hat, ist es jedoch wesentlich schwieriger, die Kaskade komplexer Wechselwirkungen vollständig zu erfassen, so daß eine wirkungsvolle Anti-Tumorreaktion stattfinden kann. Die

tatsächliche Wirksamkeit von Zytokin-sekretierenden Tumorstoffen für Anwendungen im Menschen ist noch nicht erwiesen.

Eine weitere Kategorie von Genen, mit denen Tumorzellen im Hinblick auf ihre Verwendung als Tumorstoffe verändert werden, kodiert für sog. akzessorische Proteine ("accessory proteins"); das Ziel dieses Ansatzes besteht darin, Tumorzellen in Antigen-präsentierende Zellen ("Neo-APCs") umzufunktionieren, um sie direkt Tumor-spezifische T-Lymphozyten generieren zu lassen. Ein Beispiel für einen derartigen Ansatz wird von Ostrand-Rosenberg, 1994, beschrieben.

Die Identifizierung und Isolierung von Tumorstoffen (TAs) bzw. davon abgeleiteter Peptide, z.B. durch Wölfel et al., 1994 a) und 1994 b); Carrel et al., 1993, Lehmann et al., 1989, Tibbets et al., 1993, oder in den veröffentlichten internationalen Anmeldungen WO 92/20356, WO 94/05304, WO 94/23031, WO 95/00159 beschrieben) war die Voraussetzung dafür, Tumorstoffe als Immunogene für Tumorstoffe zu verwenden, und zwar sowohl in Form von Proteinen als auch von Peptiden. Eine Tumorstoffe in Form von Tumorstoffen als solchen ist jedoch nicht ausreichend immunogen, um eine zelluläre Immunantwort auszulösen, wie sie zur Eliminierung von Tumorstoffen tragenden Tumorzellen erforderlich wäre; auch die co-Applikation von Adjuvantien bietet nur bedingte Möglichkeiten zur Verstärkung der Immunantwort (Oettgen und Old, 1991).

Eine dritte Strategie der aktiven Immuntherapie zur Steigerung der Wirksamkeit von Tumorstoffen basiert auf xenogenisierten (verfremdeten) autologen Tumorzellen. Diesem Konzept liegt die Annahme zugrunde, daß das Immunsystem auf Tumorzellen reagiert, die ein Fremdprotein exprimieren und daß im Zuge dieser Reaktion auch eine Immunantwort gegen diejenigen Tumorstoffe (TAs) hervorgerufen wird, die von den Tumorzellen der Vakzine präsentiert werden.

Eine Übersicht über diese verschiedenen Ansätze, bei denen Tumorzellen im Hinblick auf eine verstärkte Immunogenizität durch Einführung verschiedener Gene verfremdet werden, wird von Zatloukal et al., 1993, gegeben.

Eine zentrale Rolle bei der Regulierung der spezifischen Immunantwort spielt ist ein trimolekularer Komplex, bestehend aus den Komponenten T-Zell-Antigenrezeptor, MHC ("Major Histocompatibility Complex")-Molekül und dessen Liganden, der ein von einem Protein abgeleitetes Peptidfragment ist.

MHC-I-Moleküle (bzw. die entsprechenden humanen Moleküle, die HLAs) sind Peptidrezeptoren, die bei stringenter Spezifität die Bindung von Millionen verschiedener Liganden erlauben. Die Voraussetzung dafür stellen Allel-spezifische Peptidmotive dar, die folgende Spezifitätskriterien aufweisen: Die Peptide haben, in Abhängigkeit vom MHC-I-Haplotyp, eine definierte Länge, in der Regel acht bis zehn Aminosäurereste.

Typischerweise stellen zwei der Aminosäurepositionen sog. "Anker" dar, die nur durch eine einzige Aminosäure oder durch Aminosäure-Reste mit eng verwandten Seitenketten besetzt werden können. Die genaue Lage der Ankeramino-säuren im Peptid und die Anforderungen an deren Eigenschaften variieren mit den MHC-I-Haplotypen. Der C-Terminus der Peptid-Liganden ist häufig ein aliphatischer oder ein geladener Rest. Solche allelspezifische MHC-I-Peptid-Ligandenmotive sind bisher u.a. für H-2K<sup>d</sup>, K<sup>b</sup>, K<sup>k</sup>, K<sup>km1</sup>, D<sup>b</sup>, HLA-A\*0201, A\*0205 und B\*2705 bekannt.

Im Rahmen des Proteinumsatzes innerhalb der Zelle werden reguläre, entartete und fremde Genprodukte, z.B. virale Proteine oder Tumorantigene, in kleine Peptide zerlegt; einige davon stellen potentielle Liganden für MHC-I-Moleküle dar. Damit ist die Voraussetzung für deren Präsentation durch MHC-Moleküle und als Folge davon die Auslösung einer zellulären Immunantwort gegeben, wobei

noch nicht im einzelnen aufgeklärt ist, wie die Peptide als MHC-I-Liganden in der Zelle produziert werden.

Ein Ansatz, der sich diesen Mechanismus für die Verfremdung von Tumorzellen im Hinblick auf eine Verstärkung der Immunantwort zunutze macht, besteht darin, Tumorzellen mit mutagenen Chemikalien, wie N-Methyl-N'-nitrosoguanidin zu behandeln. Dies soll dazu führen, daß die Tumorzellen von mutierten Varianten zellulärer Proteine abgeleitete Neo-Antigene präsentieren, die fremde Genprodukte darstellen (Van Pel und Boon, 1982). Da jedoch die mutagenen Ereignisse zufällig über das Genom verteilt sind und außerdem zu erwarten ist, daß einzelne Zellen infolge unterschiedlicher mutagener Ereignisse auch unterschiedliche Neo-Antigene präsentieren, ist dieses Verfahren in qualitativer und quantitativer Hinsicht schwierig zu kontrollieren.

Ein anderer Ansatz verfremdet Tumorzellen dadurch, daß sie mit Genen eines oder mehrerer Fremdproteine, z.B. dem eines fremden MHC-I-Moleküls oder MHC-Proteine unterschiedlichen Haplotyps, transfiziert werden, das dann in Form an der Zelloberfläche aufscheint (EP-A2 0 569 678; Plautz et al., 1993; Nabel et al., 1993). Dieser Ansatz beruht auf der oben erwähnten Vorstellung, daß die Tumorzellen, wenn sie in Form einer Ganzzell-Vakzine verabreicht werden, anhand des exprimierten Proteins bzw. der davon abgeleiteten Peptide als fremd erkannt werden, oder daß, im Fall der Expression von autologen MHC-I-Molekülen, durch eine erhöhte Anzahl von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche die Präsentation von Tumorantigen optimiert wird. Die Veränderung von Tumorzellen mit einem Fremdprotein kann dazu führen, daß die Zellen vom Fremdprotein stammende Peptide im MHC-Kontext präsentieren und die Veränderung von "selbst" zu "fremd" im Rahmen der MHC-Peptid-Komplex Erkennung stattfindet. Die Erkennung eines Proteins oder Peptids als fremd hat zur Folge, daß im Zuge der Immunerkennung nicht nur gegen das fremde Protein, sondern auch gegen

die den Tumorzellen eigenen Tumorantigene eine Immunantwort erzeugt wird. Im Zuge dieses Prozesses werden die Antigen-präsentierenden Zellen (Antigen Presenting Cells, APCs) aktiviert, die die in der Tumorzelle des Vakzins vorkommenden Proteine (inklusive TAs) zu Peptiden prozessieren und als Liganden für ihre eigenen MHC-I und MHC-II-Moleküle verwenden. Die aktivierten, Peptid-beladenen APCs wandern in die Lymphknoten ein, wo einige wenige der naiven T-Lymphozyten die vom TA stammenden Peptide auf den APCs erkennen und als Stimulus zur klonale Expansion - mit anderen Worten zur Generierung von Tumor-spezifischen CTLs und T-Helferzellen - verwenden können.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, eine neue Tumorstoffimpfung auf der Grundlage verfremdeter Tumorzellen bereitzustellen, mit Hilfe derer eine wirksame zelluläre Anti-Tumorstoffimmunantwort ausgelöst werden kann.

Bei der Lösung der gestellten Aufgabe wurde von folgenden Überlegungen ausgegangen: Während nicht-maligne, normale Körperzellen vom Immunsystem toleriert werden, reagiert der Körper auf eine normale Zelle, wenn sie, z.B. aufgrund einer Virusinfektion, körperfremde Proteine synthetisiert, mit einer Immunabwehr. Die Ursache dafür ist darin gelegen, daß die MHC-I-Moleküle Fremdpeptide präsentieren, die von den körperfremden Proteinen stammen. Als Folge davon registriert das Immunsystem, daß etwas Unerwünschtes, Fremdes mit dieser Zelle geschehen ist. Die Zelle wird eliminiert, APCs werden aktiviert und eine neue, spezifische Immunität gegen die Fremdproteine exprimierenden Zellen generiert.

Tumorzellen enthalten zwar die jeweiligen tumorspezifischen Tumorantigene, sind aber als solche unzulängliche Stoffimpfung, weil sie aufgrund ihrer geringen Immunogenizität vom Immunsystem ignoriert werden. Beläßt man nun, im Gegensatz zu den bekannten Ansätzen, eine



Tumorzelle nicht mit einem Fremdprotein, sondern mit einem Fremdpeptid, so werden zusätzlich zu den Fremdpeptiden auch die zelleigenen Tumorantigene von dieser Zelle als fremd wahrgenommen. Durch die Verfremdung mit einem Peptid soll erreicht werden können, daß sich die durch die Fremdpeptide ausgelöste zelluläre Immunantwort gegen die Tumorantigene richtet.

Die Ursache für die geringe Immunogenizität von Tumorzellen kann nicht ein qualitatives, sondern ein quantitatives Problem sein. Für ein von einem Tumorantigen abgeleitetes Peptid kann das bedeuten, daß es zwar von MHC-I-Molekülen präsentiert wird, jedoch in einer Konzentration, die zu gering ist, um eine zelluläre tumorspezifische Immunantwort auszulösen. Eine Erhöhung der Zahl von tumorspezifischen Peptiden auf der Tumorzelle sollte somit ebenfalls eine Verfremdung der Tumorzelle bewirken, die zur Auslösung einer zellulären Immunantwort führt. Im Gegensatz zu Ansätzen, bei denen das Tumorantigen bzw. das davon abgeleitete Peptid dadurch auf der Zelloberfläche präsentiert wird, daß es mit einer für das betreffende Protein bzw. Peptid kodierenden DNA transfiziert wurde, wie in den internationalen Veröffentlichungen WO 92/20356, WO 94/05304, WO 94/23031 und WO 95/00159, beschrieben, sollte eine Vakzine bereitgestellt werden, die bei einfacherer Herstellung eine effiziente Immunantwort auslöst.

Von Mandelboim et al., 1994 und 1995, wurde vorgeschlagen, RMA-S-Zellen mit von Tumorantigenen abgeleiteten Peptiden zu inkubieren, um damit eine zelluläre Immunantwort gegen die entsprechenden patienteneigenen Tumorantigene auszulösen. Von den von Mandelboim et al. für die Tumorstimmung vorgeschlagenen Zellen der Bezeichnung RMA-S (Kärre et al., 1986) wird angenommen, daß sie Funktionen von APCs ausführen können. Sie haben die Eigenart, daß ihre HLA-Moleküle an der Zelloberfläche infolge eines Defekts im zellulären TAP-Mechanismus ("Transport of Antigenic

Peptides"; verantwortlich für die Prozessierung von Peptiden und deren Bindung an HLA-Moleküle) leer sind. Damit stehen die Zellen für die Beladung mit einem Peptid zur Verfügung, sie fungieren also gleichsam als Präsentiervehikel für das von außen angebotene Peptid. Die erzielte Anti-Tumorwirkung beruht auf der Auslösung einer Immunantwort gegen das auf den Zellen präsentierte Peptid, das dem Immunsystem ohne unmittelbaren Kontext mit dem antigenen Repertoire der Tumorzelle angeboten wird.

Die Erfindung betrifft eine Tumorstoffimpfung für die Verabreichung an einem Patienten, bestehend aus Tumorzellen, die von sich aus von Tumorstoffantigenen abgeleitete Peptide im HLA-Kontext präsentieren und von denen zumindest ein Teil mindestens einen MHC-I-Haplotyp des Patienten an der Zelloberfläche aufweist und die mit einem oder mehreren Peptiden a) und/oder b) derart beladen wurden, daß die Tumorzellen im Kontext mit den Peptiden vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen, wobei die Peptide

- a) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Stoffimpfung gemeinsam ist, fungieren, und verschieden sind von Peptiden, die abgeleitet sind von Proteinen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden, oder
- b) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Stoffimpfung gemeinsam sind, fungieren, und abgeleitet sind von Tumorstoffantigenen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden und in einer Konzentration auf den Tumorzellen der Stoffimpfung vorliegen, die höher ist als die Konzentration eines Peptids, das von demselben Tumorstoffantigen abgeleitet ist wie das auf den Tumorzellen des Patienten exprimierte.

Die humanen MHC-Moleküle werden gemäß den internationalen Gepflogenheiten im folgenden auch als "HLA" ("Human Leucocyte Antigen") bezeichnet.

Unter "zelluläre Immunantwort" ist die zytotoxische T-Zellimmunität zu verstehen, die als Folge der Generierung von tumorspezifischen zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen und CD4-positiven Helfer-T-Zellen die Zerstörung der Tumorzellen bewirkt.

Die Wirkung der erfindungsgemäßen Vakzine aus Tumorzellen beruht vor allem darauf, daß die immunogene Wirkung des auf den Tumorzellen vorhandenen Vorrats an Tumorantigenen durch das Peptid verstärkt wird.

Die Peptide des Typs a) werden im folgenden auch als "Fremdpeptide" oder "Xenopeptide" bezeichnet.

In einer Ausführungsform der Erfindung sind die Tumorzellen der Vakzine autolog. Dabei handelt es sich um Zellen, die dem zu behandelnden Patienten entnommen werden, ex vivo mit Peptid(en) a) und/oder b) behandelt, gegebenenfalls inaktiviert und danach dem Patienten wieder verabreicht werden. (Methoden zur Herstellung von autologen Tumorstoffimpfungen sind in der WO 94/21808, auf deren Offenbarung Bezug genommen wird, beschrieben).

In einer Ausführungsform der Erfindung sind die Tumorzellen allogene, d.h. sie stammen nicht von dem zu behandelnden Patienten. Der Verwendung von allopathen Zellen wird vor allem dann der Vorzug gegeben, wenn arbeitsökonomische Überlegungen eine Rolle spielen; die Herstellung von individuellen Stoffimpfungen für jeden einzelnen Patienten ist arbeits- und kostenaufwendig, außerdem treten bei einzelnen Patienten Schwierigkeiten bei der ex vivo Kultivierung der Tumorzellen auf, so daß Tumorzellen nicht in ausreichend großer Zahl erhalten werden, um eine Stoffimpfung herstellen zu können. Bei den allopathen Tumorzellen ist zu berücksichtigen, daß sie auf den HLA-Subtyp des Patienten abgestimmt sein müssen.

Im Falle der Verwendung von Fremdpeptiden der Kategorie a) handelt es sich bei allogenen Tumorzellen um Zellen einer oder mehrerer Zelllinien, von denen zumindest eine Zelllinie mindestens ein, vorzugsweise mehrere Tumorantigene exprimiert, die identisch sind mit den Tumorantigenen des zu behandelnden Patienten, d.h. die Tumorstoffe werden auf die Tumorstoffindikation des Patienten abgestimmt. Dadurch wird gewährleistet, daß die durch das MHC-I-präsentierten Fremdpeptide auf den Tumorzellen der Stoffe ausgelöste zelluläre Immunantwort, die zur Expansion von tumorspezifischen CTLs und T-Helferzellen führt, sich auch gegen die Tumorzellen des Patienten richtet, weil diese dasselbe Tumorantigen exprimieren wie die Zellen der Stoffe.

Soll z.B. eine Patientin mit der erfindungsgemäßen Tumorstoffe behandelt werden, die an Brustkrebs-Metastasen leidet, die eine Her2/neu-Mutation (Allred et al., 1992; Peopoles et al., 1994; Yoshino et al., 1994 a); Stein et al., 1994; Yoshino et al., 1994 b); Fisk et al., 1995; Han et al., 1995) aufweisen, werden als Stoffe allogene, auf den HLA-Haplotyp des Patienten abgestimmte Tumorzellen eingesetzt, die ebenfalls das mutierte Her2/neu als Tumorantigen exprimieren. In jüngerer Zeit wurden zahlreiche Tumorantigene isoliert und ihr Zusammenhang mit einer oder mehreren Krebserkrankungen aufgeklärt. Weitere Beispiele für solche Tumorantigene sind ras (Fenton et al., 1993; Gedde Dahl et al., 1992; Jung et al., 1991; Morishita et al., 1993; Peace et al., 1991; Skipper et al., 1993), MAGE-Tumorantigene (Boon et al., 1994; Slingluff et al., 1994; van der Bruggen et al., 1994; WO 92/20356); eine Übersicht über diverse Tumorantigene wird darüberhinaus von Carrel et al., 1993 gegeben.

Die Tumorantigene des Patienten werden im allgemeinen im Zuge der Erstellung von Diagnose und Therapieplan mit Standardmethoden, z.B. mit Hilfe von Assays auf der Grundlage von CTLs mit Spezifität für das zu bestimmende Tumorantigen bestimmt. Derartige Assays wurden u.a. von

Hérin et al, 1987; Coulie et al., 1993; Cox et al., 1994; Rivoltini et al., 1995; Kawakami et al., 1995; sowie in der WO 94/14459 beschrieben; diesen Literaturstellen sind auch verschiedene Tumorantigene bzw. davon abgeleitete Peptidpitope entnehmbar. Auf der Zelloberfläche auftretende Tumorantigene können auch mit Immunoassays auf Basis von Antikörpern nachgewiesen werden. Wenn die Tumorantigene Enzyme sind, z.B. Tyrosinasen, können sie mit Enzymassays nachgewiesen werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann eine Mischung von autologen und allogenen Tumorzellen als Ausgangsmaterial für die Vakzine verwendet werden. Diese Ausführungsform der Erfindung kommt insbesondere dann zur Anwendung, wenn die vom Patienten exprimierten Tumorantigene unbekannt oder nur unvollständig charakterisiert sind und/oder wenn die allogenen Tumorzellen nur einen Teil der Tumorantigene des Patienten exprimieren. Durch Beimischung von autologen, mit dem Fremdpeptid behandelten Tumorzellen wird gewährleistet, daß zumindest ein Teil der Tumorzellen der Vakzine eine möglichst große Anzahl von patienteneigenen Tumorantigenen enthält. Bei den allogenen Tumorzellen handelt es sich um solche, die in einem oder mehreren MHC-I-Haplotypen mit dem Patienten übereinstimmen.

Die Peptide des Typs a) und b) werden entsprechend der Anforderung, an ein MHC-I-Molekül zu binden, hinsichtlich ihrer Sequenz durch den HLA-Subtyp des Patienten definiert, dem die Vakzine verabreicht werden soll. Die Bestimmung des HLA-Subtyps des Patienten stellt somit eine der wesentlichen Voraussetzungen für die Auswahl bzw. Konstruktion eines geeigneten Peptids dar.

Bei der Anwendung der erfindungsgemäßen Tumervakzine in Form autologer Tumorzellen ergibt sich der HLA-Subtyp automatisch durch die beim Patienten genetisch

determinierte Spezifität des HLA-Moleküls. Der HLA-Subtyp des Patienten kann mit Standardmethoden, wie dem Mikro-Lymphotoxizitätstest (MLC-Test, Mixed Lymphocyte Culture) bestimmt werden (Practical Immunol., 1989). Der MLC-Test beruht auf dem Prinzip, aus Patientenblut isolierte Lymphozyten zunächst mit Antiserum oder einem monoklonalen Antikörper gegen ein bestimmtes HLA-Molekül in Gegenwart von Kaninchen-Komplement (C) zu versetzen. Positive Zellen werden lysiert und nehmen einen Indikator-Farbstoff auf, während unbeschädigte Zellen ungefärbt bleiben.

Zur Bestimmung des HLA-Haplotyps eines Patienten kann auch die RT-PCR herangezogen werden (Curr. Prot. Mol. Biol. Kapitel 2 und 15). Dazu entnimmt man einem Patienten Blut und isoliert daraus RNA. Diese RNA unterwirft man zunächst einer Reversen Transkription, wodurch cDNA des Patienten entsteht. Die cDNA dient als Matrize für die Polymerasekettenreaktion mit Primerpaaren, die spezifisch die Amplifikation eines DNA-Fragmentes bewirken, das für einen bestimmten HLA-Haplotyp steht. Erscheint nach Agarosegelelektrophorese eine DNA-Bande, exprimiert der Patient das entsprechende HLA-Molekül. Erscheint die Bande nicht, ist der Patient dafür negativ. Für jeden Patienten sind mindestens zwei Banden zu erwarten.

Bei der Anwendung der Erfindung in Form einer allogenen Vakzine werden Zellen verwendet, von denen zumindest ein Teil auf mindestens einen HLA-Subtyp des Patienten abgestimmt ist. Im Hinblick auf eine möglichst breite Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen Vakzine wird zweckmäßig von einer Mischung verschiedener Zelllinien ausgegangen, die zwei oder drei verschiedene der am häufigsten vertretenen HLA-Subtypen exprimieren, wobei insbesondere die Haplotypen HLA-A1 und HLA-A2 berücksichtigt werden. Mit einer Vakzine auf der Grundlage einer Mischung von allogenen Tumorzellen, die diese Haplotypen exprimieren, kann auf eine breite Patientenpopulation erfaßt werden; damit können ca. 70 %

der europäischen Bevölkerung abgedeckt werden  
(Mackiewicz et al., 1995).

Die Definition der erfindungsgemäß verwendeten Peptide durch den HLA-Subtyp bestimmt diese hinsichtlich ihrer Ankeraminosäuren und ihrer Länge; definierte Ankerpositionen und Länge gewährleisten, daß die Peptide in die Peptid-Bindungsfurche der jeweiligen HLA-Moleküle passen somit auf der Zelloberfläche der die Vakzine bildenden Tumorzellen derart präsentiert werden, daß die Zellen als fremd erkannt werden. Dies hat zur Folge, daß das Immunsystem stimuliert wird und eine zelluläre Immunreaktion auch gegen die Tumorzellen des Patienten erzeugt wird.

Peptide, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Fremdpeptide gemäß Kategorie a) geeignet sind, sind in einer großen Bandbreite verfügbar. Ihre Sequenz kann von natürlich vorkommenden immunogenen Proteinen bzw. deren zellulären Abbauprodukten, z.B. von viralen oder bakteriellen Peptiden, oder von patientenfremden Tumorantigenen abgeleitet sein.

Geeignete Fremdpeptide können z.B. auf der Grundlage von literaturbekannten Peptidsequenzen ausgewählt werden; z.B. anhand der von Rammensee et al., 1993, Falk et al., 1991, für die unterschiedlichen HLA-Motive beschriebenen, von immunogenen Proteinen verschiedenen Ursprungs abgeleiteten Peptide, die in die Bindungsfurchen der Moleküle der jeweiligen HLA-Subtypen passen. Für Peptide, die eine Teilsequenz eines Proteins mit immunogener Wirkung aufweisen, kann anhand der bereits bekannten oder gegebenenfalls noch zu bestimmenden Polypeptidsequenzen durch Sequenzabgleich unter Berücksichtigung der HLA-spezifischen Anforderungen festgestellt werden, welche Peptide geeignete Kandidaten darstellen. Beispiele für geeignete Peptide finden sich z.B. bei Rammensee et al., 1993, Falk et al., 1991, und Rammensee, 1995; sowie in der WO 91/09869 (HIV-Peptide); von Tumorantigenen abgeleitete Peptide wurden u.a. in

den veröffentlichten internationalen Patentanmeldungen WO 95/00159, WO 94/05304 beschrieben. Auf die Offenbarung dieser Literaturstellen und der darin im Zusammenhang mit Peptiden zitierten Artikel wird Bezug genommen.

Bevorzugte Kandidaten für Xenopeptide sind Peptide, deren Immunogenität bereits gezeigt wurde, also Peptide, die von bekannten Immunogenen, z.B. viralen oder bakteriellen Proteinen, abgeleitet sind. Solche Peptide zeigen aufgrund ihrer Immunogenizität eine heftige Reaktion im MLC-Test.

Statt die Originalpeptide zu verwenden, also Peptide, die unverändert von natürlichen Proteinen abgeleitet sind, können anhand der auf der Grundlage der Originalpeptidsequenz angegebenen Minimalanforderungen bezüglich Ankerpositionen und Länge beliebige Variationen vorgenommen werden, in diesem Fall werden also erfindungsgemäß künstliche Peptide verwendet, die entsprechend den Anforderungen an einen MHC-I-Liganden entworfen sind. So können z.B. ausgehend vom H2-K<sup>d</sup>-Liganden Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile (LFEAIEGFI) die Aminosäuren, die keine Ankeraminosäuren darstellen, geändert werden, um das Peptid der Sequenz Phe Phe Ile Gly Ala Leu Glu Glu Ile (FFIGALEEI) zu erhalten; außerdem kann die Ankeraminosäure Ile an Position 9 durch Leu ersetzt werden.

Peptide, die von Tumorantigenen, also von Proteinen, die in einer Tumorzelle exprimiert werden und die in der entsprechenden nicht-transformierten Zelle nicht oder in signifikant geringerer Konzentration aufscheinen, abgeleitet sind, können im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Peptide des Typs a) und/oder des Typs b) verwendet werden.

Die Länge des Peptids entspricht vorzugsweise der bzgl. der Bindung an das MHC-I-Molekül erforderlichen Minimalsequenz von 8 bis 10 Aminosäuren mit den erforderlichen Ankeraminosäuren. Gegebenenfalls kann das



Peptid auch am C- und/oder am N-Terminus verlängert sein, sofern diese Verlängerung die Bindungsfähigkeit nicht beeinträchtigt, bzw. das verlängerte Peptid auf die Minimalsequenz zellulär prozessiert werden kann.

Die Auswahl von Peptid-Kandidaten im Hinblick auf ihre Eignung als Fremdpeptide erfolgt prinzipiell in mehreren Stufen: Im allgemeinen werden die Kandidaten, zweckmäßig in Serienversuchen, zunächst in einem Peptid-Bindungstest auf ihre Bindungsfähigkeit an ein MHC-I-Molekül getestet.

Ein geeignete Untersuchungsmethode ist z.B. die auf der Durchflußzytometrie beruhende FACS-Analyse (Flow Cytometry, 1989; FACS Vantage TM User's Guide, 1994; CELL Quest TM User's Guide, 1994). Dabei wird das Peptid mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, z.B. mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und auf Tumorzellen aufgebracht, die das jeweilige MHC-I-Molekül exprimieren. Im Durchfluß werden einzelne Zellen von einem Laser einer bestimmten Wellenlänge angeregt; die emittierte Fluoreszenz wird gemessen, sie ist abhängig von der an die Zelle gebundene Peptidmenge.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der gebundenen Peptidmenge ist der Scatchard-Blot. Man benutzt dazu Peptid, das mit  $J^{125}$  oder mit Seltenerdmetallionen (z.B. Europium) markiert ist. Man belädt die Zellen bei 4°C mit verschiedenen, definierten Konzentrationen von Peptid für 30 bis 240 min. Zur Bestimmung unspezifischer Wechselwirkung von Peptid mit Zellen wird zu einigen Proben ein Überschuß nicht-markierten Peptides zugesetzt, der die spezifische Interaktion des markierten Peptids unterbindet. Anschließend wäscht man die Zellen, damit unspezifisch zell-assoziiertes Material entfernt wird. Die Menge des zell-gebundenen Peptids wird nun entweder in einem Szintillationszähler anhand der emittierten Radioaktivität, oder in einem zur Messung langlebiger Fluoreszenz geeigneten

Photometer ermittelt. Die Auswertung der so gewonnenen Daten erfolgt nach Standardmethoden.

In einem zweiten Schritt werden Kandidaten mit guten Bindungsqualitäten auf ihre Immunogenizität geprüft.

Die Immunogenizität von Xenopeptiden, die abgeleitet sind von Proteinen, deren immunogene Wirkung nicht bekannt ist, kann z.B. im MLC-Test getestet werden. Peptide, die in diesem Test, der zweckmäßig ebenfalls in Serie mit unterschiedlichen Peptiden durchgeführt wird, wobei zweckmäßig als Standard ein Peptid mit bekannt immunogener Wirkung verwendet wird, eine besonders heftige Reaktion hervorrufen, sind für die vorliegenden Erfindung geeignet.

Eine weitere Möglichkeit für die Testung von MHC-I-bindenden Peptidkandidaten auf ihre Immunogenizität besteht darin, die Bindung der Peptide an T2-Zellen zu untersuchen. Ein solcher Test beruht auf der Eigenart von T2-Zellen (Alexander et al., 1989 oder RMA-S-Zellen (Kärre et al., 1986), defekt im TAP-Peptid-Transportmechanismus zu sein und erst dann stabil MHC-I-Moleküle zu präsentieren, wenn man auf sie Peptide aufbringt, die im MHC-I-Kontext präsentiert werden. Für den Test werden z.B. T2-Zellen oder RMA-S-Zellen verwendet, die stabil mit einem HLA-Gen, z.B. mit HLA-A1- und/oder HLA-A2-Genen transfiziert sind. Werden die Zellen mit Peptiden beaufschlagt, die gute MHC-I-Liganden sind, indem sie im MHC-I-Kontext so präsentiert werden, daß sie vom Immunsystem als fremd erkannt werden können, bewirken solche Peptide, daß die HLA-Moleküle in signifikanter Menge auf der Zelloberfläche aufscheinen. Der Nachweis der HLAs auf der Zelloberfläche, z.B. mittels monoklonalen Antikörpern, erlaubt die Identifizierung geeigneter Peptide (Malnati et al., 1995; Sykulev et al., 1994). Auch hier wird zweckmäßig ein Standardpeptid mit bekannt guter HLA- bzw. MHC-Bindungsfähigkeit verwendet.

In einer Ausführungsform der Erfindung kann eine autologe oder allogene Tumorzelle der Vakzine mehrere Xenopeptide unterschiedlicher Sequenz aufweisen. Die verwendeten Peptide können sich in diesem Fall einerseits dahingehend unterscheiden, daß sie an unterschiedliche HLA-Subtypen binden. Damit kann erreicht werden, daß mehrere bzw. sämtliche HLA-Subtypen eines Patienten oder einer größeren Gruppe von Patienten erfaßt werden. Die Vakzine wird in bestrahlter Form verabreicht.

Eine weitere, gegebenenfalls zusätzliche, Variabilität hinsichtlich der auf der Tumorzelle präsentierten Xenopeptide kann darin bestehen, daß Peptide, die an einen bestimmten HLA-Subtyp binden, sich hinsichtlich ihrer nicht für die HLA-Bindung maßgeblichen Sequenz unterscheiden, indem sie z.B. von Proteinen unterschiedlichen Ursprungs, z.B. von viralen und/oder bakteriellen Proteinen, abgeleitet sind. Von einer solchen Variabilität, die dem vakzinierten Organismus eine größere Bandbreite an Verfremdung anbietet, kann eine Verstärkung der Stimulierung der Immunantwort erwartet werden.

In der Ausführungsform der Erfindung, bei der die Tumörvakzine aus einer Mischung von allogenen Tumorzellen verschiedener Zelllinien sowie gegebenenfalls zusätzlich autologen Tumorzellen besteht, können sämtliche Tumorzellen mit demselben/denselben Peptid(en) behandelt worden sein bzw. können die Tumorzellen verschiedenen Ursprungs auch jeweils verschiedene Xenopeptide aufweisen.

In den im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Versuche wurde als Fremdpeptid des Typs a) ein virales Peptid der Sequenz Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile verwendet, das sich vom Influenza-Virus Haemagglutinin ableitet und ein H2-K<sup>d</sup>-Ligand ist; die Ankeraminosäuren sind unterstrichen.

Mit diesem natürlich vorkommenden viralen Peptid als Fremdpeptid wurde eine Tumorstoffimpfung hergestellt und im Tiermodell (Melanommodell und Colonkarzinommodell) getestet.

Ein weiteres virales Peptid der Sequenz Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met, das sich vom Nukleoprotein von Influenzavirus ableitet und ein Ligand des HLA-1-Haplotyps H2-K<sup>b</sup> ist (Rammensee et. al., 1993; Ankeramino-säuren sind unterstrichen), wurde für die Herstellung einer Tumorstoffimpfung verwendet; die Schutzwirkung der Impfung wurde in einem anderen Melanommodell bestätigt.

Eine weitere Impfung wurde hergestellt, indem Tumorzellen mit einem Fremdpeptid der Sequenz Phe Phe Ile Gly Ala Leu Glu Glu Ile (FFIGALEEI) verfremdet wurden. Hierbei handelt es sich um ein synthetisches, in der Natur bisher nicht bekanntes Peptid. Bei der Auswahl der Sequenz wurde darauf geachtet, daß die Anforderungen bezüglich der Eignung als Ligand für das MHC-I-Molekül vom Typ H2-Kd erfüllt sind. Die Eignung des Peptides zur Erzeugung einer Antitumor-Immunität nach dem Konzept der aktiven Immuntherapie wurde am murinen Colon-Karzinom CT-26 (syngeneisch für den Mausstamm Balb/c) bestätigt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die Tumorstoffimpfung außerdem autologe und/oder allogene Tumorzellen und/oder Fibroblasten enthalten, die mit Zytokinen transfiziert sind. In der WO 94/21808 sowie von Schmidt et al., 1995 (auf diese Veröffentlichung wird Bezug genommen) sind effiziente Tumorstoffimpfungen beschrieben, die mittels der als "Transferrinfektion" bezeichneten DNA-Transport-Methode mit einem IL-2 Expressionsvektor erzeugt wurden (diese Methode beruht auf der Rezeptor-vermittelten Endozytose und benutzt einen mit einem Polykation, wie Polylysin, konjugierten

zellulären Liganden, insbesondere Transferrin, zur Komplexierung von DNA, sowie ein endosomolytisch wirksames Agens wie Adenovirus).

Vorzugsweise mischt man die Peptid-behandelten Tumorzellen und die Zytokin exprimierenden Zellen im Verhältnis 1:1. Wenn man z.B. eine IL-2 Vakzine, die 4.000 Einheiten IL-2 pro  $1 \times 10^6$  Zellen produziert, mit  $1 \times 10^6$  Peptid-behandelten Tumorzellen mischt, kann die so erhaltene Vakzine für zwei Behandlungen eingesetzt werden, wobei ein Dosisoptimum von 1.000 bis 2.000 Einheiten IL-2 (Schmidt et al., 1995) angenommen wurde.

Durch die Kombination der Zytokin-Vakzine mit den Peptid-behandelten Tumorzellen können vorteilhaft die Wirkungen dieser beiden Vakzine-Typen vereinigt werden.

Die Aufarbeitung der Zellen sowie die Formulierung der erfindungsgemäßen Vakzine erfolgt in herkömmlicher Weise, wie z.B. in Biologic Therapy of Cancer, 1991, oder in der WO 94/21808 beschrieben.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zur Herstellung einer Tumorstoffimpfung bestehend aus Tumorzellen zur Verabreichung an einen Patienten.

Das Verfahren ist erfindungsgemäß dadurch gekennzeichnet, daß man Tumorzellen, die von sich aus von Tumorstoffantigenen abgeleitete Peptide im HLA-Kontext präsentieren und von denen zumindest ein Teil mindestens einen MHC-I-Haplotyp des Patienten exprimiert, mit einem oder mehreren Peptiden behandelt, die

- a) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Stoffimpfung gemeinsam sind, fungieren, und verschieden sind von Peptiden, die abgeleitet sind von Proteinen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden, oder die
- b) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Stoffimpfung gemeinsam sind, fungieren, und abgeleitet sind von

Tumorantigenen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden,

wobei man die Tumorzellen mit einem oder mehreren Peptiden a) und/oder b) so lange und in einer solchen Menge in Gegenwart eines organischen Polykations inkubiert, bis die Peptide an die Tumorzellen derart gebunden sind, daß sie im Kontext mit den Tumorzellen vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen.

Die Menge an Peptid beträgt vorzugsweise ca. 50 µg bis ca. 160 µg pro  $1 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^7$  Zellen. Im Falle der Verwendung eines Peptids der Kategorie b) kann die Konzentration auch höher sein. Für diese Peptide ist es wesentlich, daß ihre Konzentration auf den Tumorzellen der Vakzine gegenüber der Konzentration eines Peptids auf den Tumorzellen des Patienten, das von demselben Tumorantigen abgeleitet ist, derart erhöht ist, daß die Tumorzellen der Vakzine als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen.

Zu geeigneten Polykationen zählen homologe organische Polykationen wie Polylysin, Polyarginin, Polyornithin oder heterologe Polykationen mit zwei oder mehr unterschiedlichen positiv geladenen Aminosäuren, wobei diese Polykationen verschiedene Kettenlänge aufweisen können, ferner nicht-peptidische synthetische Polykationen wie Polyethylenimine, natürliche DNA-bindende Proteine polykationischen Charakters wie Histone oder Protamine bzw. Analoge oder Fragmente davon, sowie Spermin oder Spermidine. Zu im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeigneten organischen Polykationen zählen auch polykationische Lipide (Felgner et al., 1994; Loeffler et al., 1993; Remy et al., 1994; Behr, 1994), die u.a. kommerziell als Transfectam, Lipofectamin oder Lipofectin erhältlich sind.

Als Polykation wird bevorzugt Polylysin (pL) einer Kettenlänge von ca. 30 bis ca. 300 Lysinresten eingesetzt.

Die erforderliche Menge an Polykation im Verhältnis zum Peptid kann im einzelnen empirisch bestimmt werden. Im Falle der Verwendung von Polylysin und Xenopeptiden der Kategorie a) beträgt das Masseverhältnis pL:Peptid vorzugsweise ca. 1:4 bis ca 1:12.

Die Dauer der Inkubation beträgt im allgemeinen 30 min bis 4 h. Sie richtet sich danach, zu welchem Zeitpunkt die maximale Beladung mit dem Peptid erreicht ist; der Beladungsgrad kann mittels FACS-Analyse verfolgt und auf diese Weise die erforderliche Inkubationsdauer ermittelt werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird das Polylysin in zumindest teilweiser konjugierter Form eingesetzt. Vorzugsweise liegt ein Teil des Polylysins in mit Transferrin (Tf) konjugierter Form (Transferrin-Polylysin-Konjugat TfpL, diesbezüglich wird ebenfalls auf die Offenbarung der WO 94/21808 Bezug genommen) vor, wobei das Masseverhältnis pL:TfpL vorzugsweise ca. 1:1 beträgt.

Statt mit Transferrin kann Polylysin mit anderen Proteinen, z.B. den in der WO 94/21808 als Internalisierungsfaktoren beschriebenen zellulären Liganden, konjugiert werden.

Gegebenfalls findet die Behandlung der Tumorzellen außerdem in Gegenwart von DNA statt. Die DNA liegt zweckmäßig als Plasmid vor, vorzugsweise als Plasmid, das frei ist von Sequenzen, die für funktionelle eukaryotische Proteine kodieren, also als Leervektor. Als DNA kann prinzipiell jedes gängige, funktionell erhältliche Plasmid verwendet werden.

Die Menge an DNA im Verhältnis zu dem, gegebenenfalls teilweise mit einem Protein konjugierten Polykation, z.B. zu pL, TfpL oder einer Mischung von pL mit TfpL, beträgt vorzugsweise ca. 1:2 bis ca.1:5.

Die Dauer der Inkubation, die Menge und Art des Polykations im Verhältnis zu der Zahl der Tumorzellen und/oder der Menge an Peptid, ob bzw. in welchem Anteil das Polykation bzw. mit welchem Protein es vorteilhaft konjugiert ist, der Vorteil der Anwesenheit von DNA bzw. deren Menge können empirisch bestimmt werden. Dazu werden die einzelnen Verfahrensparameter variiert und die Peptide unter ansonsten identischen Bedingungen auf die Tumorzellen aufgebracht und überprüft, wie effizient die Peptide an die Tumorzellen gebunden haben. Eine geeignete Methode dafür ist die FACS-Analyse.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich außer zur Behandlung von Tumorzellen auch zur Behandlung anderer Zellen.

Statt Tumorzellen können autologe, also patienteneigene, Fibroblasten, oder Zellen von Fibroblastenzelllinien, die entweder auf den HLA-Subtyp des Patienten abgestimmt oder die mit dem entsprechenden MHC-I-Gen transfiziert worden sind, nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mit einem oder mehreren Peptiden beladen werden, die von Tumorantigenen abgeleitet sind, die von den Tumorzellen des Patienten exprimiert werden. Die so behandelten und bestrahlten Fibroblasten können als solche oder in Mischung mit Peptid-behandelten Tumorzellen als Tumervakzine verwendet werden.

In einer weiteren Ausführungsform können statt Fibroblasten dendritische Zellen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelt werden. Dendritische Zellen sind APCs der Haut; sie können wahlweise *in vitro* beladen werden, d.h. aus dem Patienten isolierte Zellen werden *in vitro* mit einem oder mehreren Peptiden versetzt, wobei die Peptide von Tumorantigenen des Patienten abgeleitet sind und an ein MHC-I- oder an ein MHC-II-Molekül des Patienten binden. In einer weiteren Ausführungsform können diese Zellen auch *in vivo* mit dem Peptid beladen werden. Dazu



injiziert man die Komplexe aus Peptid, Polykation und gegebenenfalls DNA vorzugsweise intradermal, weil in der Haut dendritische Zellen besonders häufig vorzufinden sind.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde das Peptid mit TfpL oder pL für den Transfer in CT-26 Zellen und mit TfpL und einem nicht funktionellen Plasmid (Leervektor) für den in M-3 Zellen komplexiert.

Im CT-26 System wurde festgestellt, daß die mit dem Peptid verfremdeten, bestrahlten Tumorstoffe eine effiziente Antitumor-Immunität generierten: 75 % der geimpften Mäuse konnten eine Tumorchallenge eliminieren, die bei allen Kontrolltieren, die entweder keine Vakzine oder eine Vakzine ohne das Xenopeptid erhielten, zu Tumorbildung führte. Im M-3 System wurde dasselbe Xenopeptid unter Bedingungen, die für den Organismus hinsichtlich Tumorbildung noch höhere Stringenz aufwiesen, in einem experimentellen Ansatz getestet, der der Situation im Menschen nachempfunden ist. Metastasen-tragende Mäuse wurde mit xenopeptisierten, bestrahlten M-3 Zellen geimpft. 87.5 % der so geimpften Mäuse konnten die Metastasen eliminieren, während alle unbehandelten und 7/8 Mäusen an Tumoren erkrankten, die Vakzine ohne das Xenopeptide erhalten hatten.

Es wurde außerdem festgestellt, daß das Ausmaß der systemischen Immunantwort der Tumorstoffe von der Methode abhängig ist, mit der das Peptid auf die Tumorzellen aufgebracht wird. Wenn das Peptid mittels Polylysin/Transferrin den Zellen verabreicht wurde, war der Effekt deutlich ausgeprägter als wenn die Zellen 24 h mit dem Peptid inkubiert wurden ("Pulsen"). Auch das adjuvante Beimischen des Peptides zu den bestrahlten Vakzinen war wenig effizient. Durch die Transferrininfektion dürfte entweder eine effizientere Aufnahme des Peptides in die Zellen gewährleistet sein, oder aber die Beladung mit Polylysin/Transferrin bewirkt, daß das Peptid an der Zellmembran haften bleibt, somit physikalisch in die Nähe der MHC-I-

Moleküle gebracht wird und dann an diese binden kann, wobei es aufgrund seiner starken Affinität zelluläre Peptide, die schwächer gebunden sind, verdrängen kann.

In einer Abwandlung der Erfindung kann eine zelluläre, vorzugsweise eine systemische, Immunantwort gegen pathogene Erreger bzw. eine Anti-Tumorantwort auch ausgelöst werden, indem eine Vakzine verabreicht wird, die ein oder mehrere Peptide enthält, die statt im Kontext mit Zellen zusammen mit einem Adjuvans vorliegen. Diese Vakzine ist also eine zellfreie Vakzine.

Das Peptid ist abgeleitet von einem Antigen, gegen das die zelluläre Immunantwort ausgelöst werden soll. Damit wird bewirkt, daß T-Zellen generiert werden, die den Krankheitserreger bzw. die Tumorzellen, die das Antigen aufweisen, erkennen.

Für die Immunisierung gegen pathogene Krankheitserreger, wie Bakterien, Viren, Parasiten, werden Peptide verwendet, die abgeleitet sind von einem Protein des bzw. der jeweiligen Erreger.

In einer Ausführungsform ist das Peptid, im Hinblick auf die Auslösung einer zellulären Anti-Tumorantwort, von einem Tumorantigen abgeleitet. Eine ein solches Peptid enthaltende Tumorstoffvakzine kann therapeutisch oder prophylaktisch verabreicht werden. Bei der prophylaktischen Anwendung wird zweckmäßig eine Mischung von Peptiden eingesetzt, die abgeleitet sind von Vertretern häufig auftretender Tumorantigene. Bei der therapeutischen Anwendung der zellfreien Tumorstoffvakzine werden ein oder mehrere Peptide verwendet, die von Tumorantigen(en) des Patienten abgeleitet sind.

Eine weitere Anforderung, die das Peptid erfüllen muß, ist seine Abstimmung auf den HLA-1- oder HLA-2-Subtyp des zu vakzinierenden Individuums; das Peptid weist also eine Sequenz auf bzw. enthält eine Sequenz, die seine Bindung an ein HLA-1- oder HLA-2-Molekül gewährleistet.

Im Hinblick auf eine möglichst breite Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen Vakzine wird zweckmäßig eine Mischung mehrerer Peptide verwendet, von denen jedes an ein anderes HLA-Molekül binden kann, vorzugsweise an einen von zwei oder drei der am häufigsten vertretenen HLA-Subtypen, wobei im Falle der Abstimmung des Peptids auf den HLA-1 Subtyp insbesondere die Haplotypen HLA-A1 und HLA-A2 berücksichtigt werden. Mit einer Vakzine auf der Grundlage einer Mischung von Peptiden, die an diese Haplotypen binden können, kann eine breite Patientenpopulation erfaßt werden.

Das Adjuvans hat die Eigenschaft, den Eintritt des Peptids in die Zelle zu erleichtern, indem es z.B. die Membranen von Zielzellen, in die das Peptid gelangen soll, zumindest kurzfristig durchlässig macht, um auf diese Weise das Peptid in die Zelle zu befördern. Dafür dürfte es von Vorteil, aber nicht unbedingt erforderlich sein, daß das Peptid an das Adjuvans gebunden wird; es kann ein Import des Peptids in die Zelle auch dadurch bewirkt werden, daß das Peptid aufgrund seiner räumlichen Nähe zur Zellmembran durch diese hindurch gelangen kann, sobald das Adjuvans deren Durchlässigkeit bewirkt hat. Die Wirkung des Adjuvans kann auch darauf beruhen, daß es die für die Aufnahme in die Zelle kritische Konzentration des Peptids an der Zelloberfläche erhöht oder daß es die Phagozytose oder den Flüssigtransport (Pinozytose) des Peptids in die Zelle bewerkstelligt.

Als Adjuvantien können u.a. grundsätzlich alle diejenigen Membran-permeabilisierenden Substanzen verwendet werden, die für den Transport von Nukleinsäuren in die Zelle verwendet werden; in diesem Zusammenhang wird auf die Offenbarung der WO 93/19768 verwiesen, wo derartige Substanzen genannt sind.

Bevorzugt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Adjuvans Polylysin verwendet. Das Polylysin (oder eine andere polykationische Verbindung mit ähnlicher Wirkung)

kann auch, gegebenenfalls konjugiert mit einem zellulären Liganden, als Bestandteil eines Komplexes mit DNA und gegebenenfalls einem endosomolytisch wirkenden Mittel, z.B. Adenovirus (entsprechend der Herstellung der zellulären Vakzine durch Beladen der Zellen mit Peptid mittels solcher Komplexe), eingesetzt werden

Ohne auf die Theorie festgelegt sein zu wollen, dürfte die Wirkung der zellfreien Vakzine darin bestehen, daß das Peptid mit Hilfe des Adjuvans in die Zielzellen eindringt. Zielzellen sind Antigen-präsentierende Zellen, auf denen das Peptid, gegebenenfalls nach Prozessierung, den T-Zellen im HLA-1- und/oder HLA-2-Kontext präsentiert wird. Beispiele für Zielzellen sind Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten oder dendritische Zellen.

Gegebenenfalls ist das Adjuvans mit einem Liganden für die Zielzelle modifiziert. Als Liganden kommen Kohlenhydratreste, wie Mannosyl (ein Ligand für Makrophagen), oder Antikörper(fragmente) gegen Zelloberflächenproteine der Zielzellen in Frage.

Als Adjuvantien können auch Komponenten in Partikelform, gegebenenfalls zusätzlich zu den oben erwähnten Adjuvantien (z.B. Polylysin), verwendet werden. Für die Partikel sind grundsätzlich Materialien geeignet, die auch für die Herstellung von Säulen für die Peptidsynthese verwendet werden, z.B. Kieselgel oder Kunstharze, sofern sie physiologisch annehmbar sind und aus ihnen Partikel herstellbar sind, die genügend klein sind, um in die Zelle gelangen. Mit Hilfe von Partikeln können hohe lokale Konzentrationen an Peptid erreicht werden, was dessen Aufnahme in die Zellen erleichtert.

Die Verabreichung der zellfreien Vakzine kann subkutan oder intradermal erfolgen, um vor allem Hautzellen (Keratinozyten, Fibroblasten), dendritische Zellen, Langerhanszellen oder Makrophagen als Zielzellen zu erreichen; eine weitere Form der Applikation ist die

intraperitoneale, um die Lymphknoten zu erreichen. Im Rahmen einer Tumorthherapie kann die Tumorstoffe auch intratumoral verabreicht werden. Eine weitere Verabreichungsroute ist die intravenöse, um Monozyten, B-Zellen oder dendritische Vorläuferzellen zu erreichen.

### Figurenübersicht

- Fig. 1a: FACS-Analyse von Fremdpeptid-behandelten M-3-Zellen
- Fig. 1b: Mikrofotografien von FITC-Peptid-behandelten M-3-Zellen
- Fig. 2: Heilung von M-3-Melanommetastasen tragenden DBA/2-Mäusen durch eine Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen M-3-Zellen
- Fig. 3a: Titration von Fremdpeptid für die Herstellung einer Tumorstoffe
- Fig. 3b: Vergleich einer Tumorstoffe aus Fremdpeptid-beladenen Tumorzellen mit einer IL-2 sekretierenden Tumorstoffe
- Fig. 4a: Schutz von Balb/c-Mäusen durch Vorimmunisierung mit einer Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Colonkarzinomzellen
- Fig. 4b: Untersuchung der Beteiligung von T-Zellen an der systemischen Immunität
- Fig. 5: Schutz von C57BL/6J-Mäusen durch Vorimmunisierung mit einer Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Melanomzellen
- Fig. 6: Schutz von DBA/2-Mäusen gegen Mastozytom durch Vorimmunisierung mit einer zellfreien Tumorstoffe, enthaltend ein tumorspezifisches Peptid

In den folgenden Beispielen wurden, wenn nicht anders angegeben, die folgenden Materialien und Methoden verwendet:

Die Maus-Melanomzelllinie Cloudman S91 (Klon M-3; ATCC No. CCL 53.1), die Mastozytomzelllinie P815 (ATCC Nr. TIB 64) und die Fibroblastenzelllinie NIH3T3 (ATCC Nr. CRL 1658) wurden von ATCC erworben.

Die Melanomzelle B16-F10 (Fidler et al., 1975) wurde vom NIH DCT Tumor Depository erworben.

Die Herstellung von Transferrin-Polylysin-Konjugaten, von DNA enthaltenden Transfektionskomplexen wurde vorgenommen, wie in der WO 94/21808 beschrieben.

Die Peptide LFEAIEGFI, FFIGALEEI, LPEAIEGFG, KYQAVTTTL und ASNENMETM wurden auf einem Peptid-Synthesizer (Modell 433 A mit Feedbackmonitor, Applied Biosystems, Foster City, Kanada) unter Verwendung von TentaGel S PHB (Rapp, Tübingen) als Festphase nach der Fmoc-Methode (HBTU-Aktivierung, Fastmoc<sup>TM</sup>, Maßstab 0:25 mmol) synthetisiert. Die Peptide wurden in 1 M TEAA, pH 7.3 aufgelöst und mittels reverser Chromatographie auf einer Vydac C 18-Säule gereinigt. Die Sequenzen wurden mittels Flugzeitmassenspektrometrie auf einem MAT Lasermat (Finnigan, San Jose, Kanada) bestätigt.

Die Testung der Wirksamkeit der Krebsvakzine auf ihre Schutzwirkung gegen Metastasenbildung ("Therapeutisches Mausmodell") sowie die Testung im prophylaktischen Mausmodell wurde nach dem in der WO 94/21808 beschriebenen Protokoll durchgeführt, wobei als Mausmodell das DBA/2-Modell und das Balb/c-Modell verwendet wurden.

#### Beispiel 1

Vergleichende FACS-Analyse von M-3-Zellen, die mittels verschiedenen Methoden mit Fremd-Peptid behandelt wurden

Für diese Untersuchung, die in Fig. 1 dargestellt ist, wurde das Xenopeptid LFEAIEGFI auf M-3-Zellen einmal

mit TfpL/DNA-Komplexen aufgebracht ("Transloading"; Fig. 1a), einmal wurden die Zellen mit dem Peptid inkubiert ("Pulsen"; Fig. 1b) und einmal wurde das Peptid den Zellen adjuvant beigemischt (Fig. 1c).

Für das Transloading wurden 160 µg FITC-markiertes Xenopeptid LFEAIEGFI bzw. unmarkiertes Kontrollpeptid mit 3 µg Transferrin-Polylysin (TfpL), 10 µg pL und 6 µg psp65 (Boehringer Mannheim, LPS frei) in 500 µl HBS-Puffer gemischt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die obige Lösung in eine T 75 Zellkulturflasche mit  $1.5 \times 10^6$  M-3 Zellen in 20 ml DMEM-Medium (10 % FCS, 20 mM Glukose) gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 3 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit PBS/2 mM EDTA abgelöst und für die FACS-Analyse im 1 ml PBS/5 % FCS resuspendiert.

Das Pulsen der Zellen mit dem Peptid wurde mit  $1 - 2 \times 10^6$  Zellen in 20 ml DMEM mit 450 µg Peptid (FITC-markiert bzw. unmarkiert) während 3 h bei 37°C durchgeführt.

Für das adjuvante Beimischen wurden vor der FACS-Analyse  $10^6$  von der Kulturflasche abgelöste Zellen mit 100 µg FITC-markiertem Peptid in 1 ml PBS/5% FCS 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden nach Austausch von PBS/5% FCS gewaschen und noch einmal analysiert. Die FACS-Analyse wurde unter Verwendung eines FACS Vantage Geräts (Becton Dickinson), ausgerüstet mit einem 5 W Argon Laser, eingestellt auf 100 mW bei 488 nm, nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Das Ergebnis der FACS-Analyse ist in den Fig. 1a bis 1c dargestellt. Fig. 1d zeigt Mikrofotografien von zytozentrifugierten M-3-Zellen: das obere Bild zeigt Zellen, die das Peptid mittels dem Komplex ("Transloading") erhalten hatten, das untere Bild zeigt Zellen, die mit dem Peptid inkubiert ("Pulsen") worden waren. Für die Gegenfärbung des Kerns wurde DAPI verwendet.

M-3-Zellen, die mit dem das Peptid enthaltenden Komplex beladen worden waren, zeigten eine Verschiebung der Fluoreszenz um beinahe 2 Zehnerpotenzen im Vergleich zu unbehandelten oder mit Polylysin allein behandelten Zellen, was auf einen effizienten Transfer des Peptids auf die Zellen mittels TfpL/DNA-Komplex hinweist (Fig. 1a). Die Inkubation mit Peptid (Pulsen) war weniger wirksam, was sich in der Verschiebung der Fluoreszenz um nur eine Zehnerpotenz niederschlägt, die in der Fluoreszenzmikroskopie praktisch nicht nachweisbar war (Fig. 1d). Im Falle des adjuvanten Beimischens verschwand das Peptid nach dem Waschschrift (Fig. 1c), was daraufhindeutet, daß die Peptidbindung höchstens geringfügig war.

## Beispiel 2

Heilung von Melanommetastasen aufweisenden DBA/2-Mäusen mit einer Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Melanomzellen ("Therapeutisches Mausmodell")

### a) Herstellung einer Tumorstakzine aus M-3-Zellen

160 µg Xenopeptid LFEAIEGFI wurden mit 3 µg Transferrin-Polylysin (TfpL), 10 µg pL und 6 µg psp65 (LPS frei) in 500 µl HBS-Puffer gemischt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die obige Lösung in eine T 75 Zellkulturflasche mit  $1.5 \times 10^6$  M-3 Zellen in 20 ml DMEM-Medium (10 % FCS, 20 mM Glukose) gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 3 h wurden die Zellen mit 15 ml frischem Medium versetzt und über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 4 h vor der Applikation wurden die Zellen mit 20 Gy bestrahlt. Die Aufarbeitung der Vakzine erfolgte wie in WO 94/21808 beschrieben.

### b) Wirksamkeit der Tumorstakzine

6 - 12 Wochen alte DBA/2 Mäuse mit einer Fünftages-Metastase (erzeugt durch die subkutane Injektion von  $10^4$  lebenden M-3 Zellen) wurden zweimal im Abstand von



einer Woche mittels subkutaner Injektion mit der Tumorstoffvakzine behandelt (Dosis:  $10^5$  Zellen/Tier). Es standen 8 Mäuse im Experiment. Das Ergebnis der Versuche ist in Fig. 2a dargestellt; es zeigte sich, daß 7 von 8 Tieren nach Verabreichung der Vakzine, die mittels TfpL/DNA-Komplexen auf die Tumorzellen geladenes Peptid enthielten, geheilt wurden. In Vergleichsversuchen wurde eine Vakzine verwendet, in der das Peptid LFEAIEGFI (400  $\mu$ g oder 4 mg) mittels Inkubation (3 h bei 37°C; "Pulsen") auf die Zellen aufgebracht worden war. Von den Tieren, die eine Vakzine mit 400  $\mu$ g Peptid erhalten hatten, blieben 3 von 8 tumorfrei, die Vakzine aus mit 4 mg Peptid behandelten Zellen heilte nur 1 von 8 Tieren. Kontrollen waren bestrahlte M-3-Zellen allein sowie Zellen, die ohne Peptid mit den Komplexen beladen worden waren (jeweils 1/8 Tieren blieb tumorfrei). Bei der Gruppe der Kontrolltiere, die keinerlei Behandlung unterzogen worden, entwickelten alle Tiere Tumore.

Um die Relevanz einerseits der Herstellungsmethode der Vakzine, andererseits der Peptidsequenz zu untersuchen, wurde eine weitere Versuchsserie durchgeführt; in diesen Experimenten wurde eine hochoptimale Variante der M-3-Zellen verwendet. In den Versuchen, in denen die Bedeutung der Behandlungsmethode getestet wurde, wurden Vakzine hergestellt, in denen das Peptid nicht mittels Polylysin-Transferrin auf die Zellen geladen wurde, sondern den Zellen lediglich adjuvant beigemischt wurde. Für die Kontrolle bezüglich der Peptidsequenz wurden die Ankeraminosäuren des Peptids an Position 2 und 9, nämlich Phenylalanin und Isoleucin, durch Prolin bzw. Glycin ersetzt, was zum Peptid Leu Pro Glu Ala Ile Glu Gly Phe Gly (LPEAIEGFG) führte; diesem Peptid fehlt die Fähigkeit zur H2-K<sup>d</sup>-Bindung. Die Metastasenbildung wurde mindestens einmal pro Woche kontrolliert. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Fig. 2b zu sehen. Die Vakzine, hergestellt durch Beladen der Zellen mit LFEAIEGFI mittels den TfpL/DNA-Komplexen, heilte 6 von 8 Tieren. Hingegen entwickelten

7 von 8 Tieren Tumore, die eine Vakzine erhalten hatten, für die das Peptid LFEAIEGFI den Zellen lediglich beigemischt wurde bzw. die aus Zellen bestand, die mittels TfpL/DNA-Komplexen mit dem veränderten, nicht an das HLA-Motiv bindenden Peptid LPEAIEGFG beladen wurden. In der Kontrollgruppe, die mit nur bestrahlten M-3-Zellen behandelt worden war bzw. die keinerlei Behandlung erhielt, entwickelten alle Tiere Tumore.

#### c) Untersuchung des Einflusses der Peptidmenge in der Vakzine

Es wurden, wie in a) beschrieben, Peptid enthaltende Komplexe hergestellt, die entweder 50, 5 oder 0.5 µg des wirksamen Peptides LFEAIEGFI enthielten, und damit M-3 Zellen beladen. Als Vergleich diente eine IL-2 Vakzine, die die optimale Dosis an IL-2 sekretierte (s. d) ). Mit dieser Vakzine wurden DBA/2 Mäuse geimpft, die eine Fünftagesmetastase trugen. Die Vakzine mit 50 µg Peptid heilte 6 von 8 Mäusen, die mit 5 µg 4 von 8, ebenso wie die IL-2 Vakzine, während die 0.5 µg enthaltene Vakzine nur 2 von 8 Tieren heilte. Dieser Versuch ist in Fig. 3a dargestellt.

#### Beispiel 3

Vergleich der Fremdpeptid enthaltenden Vakzine mit einer Tumervakzine aus IL-2 sekretierenden Tumorzellen im prophylaktischen Mausmodell

In Vergleichsversuchen wurden zwei Gruppen von Versuchstieren (je 8) einerseits mit der in Beispiel 2a) beschriebenen Vakzine, andererseits mit einer Vakzine aus IL-2 sekretierenden M-3-Zellen (hergestellt nach dem in der W0 94/21808 beschriebenen Protokoll, IL-2-Dosis 2.000 Einheiten pro Tier) in einem Abstand von 1 Woche 2 x vorimmunisiert. Eine Woche nach der letzten Vakzinierung wurden, bei steigender Zahl von Tumorzellen, contralateral Tumore gesetzt ("Challenge"; die Dosis ist in Fig. 3b angegeben). Es zeigte sich,

daß die Vorimmunisierung mit der erfindungsgemäßen Tumorstoffvakzine einer Behandlung mit der IL-2-Vakzine überlegen war: naive Mäuse, geimpft mit der IL-2-Vakzine, waren nur gegen eine Dosis von  $10^5$  lebenden, hochtumorigenen Zellen (M-3-W) geschützt. Die Kapazität dieser Vakzine war jedoch bei einer Challenge von  $3 \times 10^5$  Zellen erschöpft, während eine Tumorbelaftung dieses Ausmaßes von Tieren, die mit der Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Tumorzellen vorimmunisiert worden waren, erfolgreich bekämpft wurde.

#### Beispiel 4

Schutz von Balb/c-Mäusen durch Vorimmunisierung mit einer Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Colonkarzinomzellen ("Prophylaktisches Mausmodell")

##### a) Herstellung der CT-26 Vakzine

160  $\mu\text{g}$  Xenopeptid LFEAIEGFI bzw. FFIGALEEI wurden mit 12  $\mu\text{g}$  pL bzw. mit 3  $\mu\text{g}$  Transferrin-Polylysin plus 10  $\mu\text{g}$  Polylysin, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur in 500  $\mu\text{l}$  HBS-Puffer komplexiert und anschließend in eine T 75 Zellkulturflasche mit  $1.5 \times 10^6$  CT-26 Zellen in 4 ml ~~DMEM~~ MEM-Medium (10 % FCS, 20 mM Glukose) transferiert, anschließend wurde bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach 4 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 15 ml frischem Medium versetzt und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. 4 h vor der Applikation wurden die Zellen mit 100 Gy bestrahlt. Die Aufarbeitung der Vakzine erfolgte wie in der WO 94/21808 beschrieben.

##### b) Testung der Wirksamkeit der Krebsvakzine auf ihre Schutzwirkung gegen CT-26 Challenge

6 - 12 Wochen alte Balb/c Mäuse wurden zweimal in einwöchigem Abstand durch subkutane Injektion vakziniert (Zelldosis:  $10^5$ /Maus). Pro Gruppe standen 8 Mäuse (bzw. 7 Mäuse bei dem Versuch, bei dem pL für das Beladen der Zellen verwendet wurde) im Experiment. Eine

Woche nach der letzten Vakzinierung wurden contralateral Tumore mit  $5 \times 10^4$  parentalen CT-26-Zellen gesetzt. Vergleichsversuche, in denen die Vakzine auf andere Weise als mittels den Komplexen aus TfpL/DNA hergestellt wurde sowie die Kontrollen wurden durchgeführt, wie in Beispiel 2 beschrieben. Das Auswachsen der Tumorchallenge wurde mindestens einmal pro Woche kontrolliert. Das Ergebnis für Peptid LFEAIEGFI ist in Fig. 4a zu sehen; es wurden 6 von 8 Tieren geschützt. Im Fall von Peptid FFIGALEEI (nicht in Fig. 4a gezeigt, wurden 4 von 8 Tieren geschützt).

#### c) Beteiligung von T-Zellen an der Wirkung der Tumorstoffe

Um die Beteiligung von T-Zellen an der durch die CT-26-Vakzine bewirkten systemischen Immunität nachzuweisen, wurden in einem weiteren Versuch 24 h vor der Vakzinierung CD4<sup>+</sup>-Zellen durch intravenöse Injektion von 500 µg monoklonalen Antikörper GK1.5 (ATCC TIB 207), CD8<sup>+</sup>-Zellen durch intravenöse Injektion von 500 µg monoklonalen Antikörper 2.43 (ATCC TIB 210) entfernt. Eine positive Kontrollgruppe erhielt die Vakzine, ohne daß CD4<sup>+</sup>-Zellen und CD8<sup>+</sup>-Zellen entfernt worden waren. Das Ergebnis der Versuche ist in Fig. 4b dargestellt: Die Beteiligung der T-Zellen zeigt sich daran, daß alle Tiere, denen T-Zellen entfernt worden waren, Tumore entwickelten.

#### Beispiel 5

Schutz von C57BL/6J-Mäusen durch Vorimmunisierung mit einer Vakzine aus Fremdpeptid-beladenen Melanomzellen ("Prophylaktisches Mausmodell")

In diesem Beispiel wurden als Versuchstiere Mäuse vom Stamm C57BL/6J verwendet (jeweils 8 Tiere pro Gruppe). Als Melanomzellen wurden die für den verwendeten

Mausstamm syngenen Zellen B16-F10 (NIH DCT Tumor Depository; Fidler et al., 1975) verwendet.

Die Tiere aller Versuchsgruppen wurden zweimal in einwöchigem Abstand durch subkutane Injektion von  $10^5$  B16-F10-Zellen pro Maus vakziniert:

In einer Versuchsserie wurde die Vakzine hergestellt, indem bestrahlte B16-F10-Zellen mit dem Peptid der Sequenz ASNENMETM beladen wurden, wie in Beispiel 2 für die Vakzine aus M-3-Zellen beschrieben.

In Parallelversuchen wurden IL-2 bzw. GM-CSF sekretierende B16-F10-Zellen (hergestellt nach dem in der WO 94/21808 beschriebenen Protokoll) als Vakzine für die Vorimmunisierung verwendet; die Vakzine produzierte 1.000 Einheiten IL-2 bzw. 200ng GM-CSF pro Tier.

Eine Kontrollgruppe erhielt für die Vorimmunisierung bestrahlte und ansonsten unbehandelte B16-F10-Zellen

Eine Woche nach der letzten Vakzinierung wurden den Versuchstieren mit  $1 \times 10^4$  lebenden, bestrahlten B16-F10-Zellen Tumore gesetzt und anschließend das Tumorstadium verfolgt.

Das Ergebnis der Versuche ist in Fig. 5 dargestellt; die mit dem Fremdpeptid beladenen Tumorzellen zeigten die beste Schutzwirkung vor Tumorbildung.

#### Beispiel 6

Schutz von DBA/2-Mäusen gegen Mastrozytom durch Vorimmunisierung mit einer zellfreien Tumorstoffvakzine, enthaltend ein tumorspezifisches Peptid ("Prophylaktisches Mausmodell")

160  $\mu\text{g}$  des Peptids der Sequenz KYQAVTTTL (Bezeichnung: P815), eines Liganden von H2-K<sup>d</sup>, abgeleitet von dem von Lethe et al., 1992, beschriebenen Tumorantigen, wurden mit 11.8  $\mu\text{g}$  Polylysin300 in 500  $\mu\text{l}$  HBS gemischt und 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 500  $\mu\text{l}$  EBSS (Earl's gepufferte Salzlösung) beigegeben. Je 100  $\mu\text{l}$  der erhaltenen Mischung wurden 8 Mäusen in einwöchigem Abstand subkutan verabreicht. Nach dieser Vorimmunisierung wurden nach einer weiteren Woche Tumore gesetzt, indem jeder Maus contralateral  $5 \times 10^4$  Zellen der Mastozytomzelllinie P815 (ATCC Nr. TIB 64; diese Zellen exprimieren das Tumorantigen, von dem das Peptid P815 abgeleitet ist) in 100  $\mu\text{l}$  EBSS injiziert wurden. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Fig. 6 (gefüllte Quadrate) dargestellt.

In einem Parallelversuch wurden 200  $\mu\text{g}$  des Peptids mit 500  $\mu\text{l}$  HBS gemischt und anschließend mit 500  $\mu\text{l}$  Freund's Adjuvans emulgiert. Mit je 100  $\mu\text{l}$  der erhaltenen Emulsion wurden 8 Mäuse vorimmunisiert und anschließend mit P815-Zellen Tumore gesetzt, wie oben angegeben (Fig. 6: gefüllte Kreise).

Für einen weiteren Parallelversuch wurde eine zelluläre Tumorzakzine hergestellt, wie in Beispiel 2a) beschrieben, mit dem Unterschied, daß statt M-3-Zellen Zellen der allogenen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 (ATCC Nr. CRL 1658) und als Peptid P815 verwendet wurde. Die Vorimmunisierung mit dieser Vakzine wurde in einwöchigem Abstand mit  $10^5$  Zellen vorgenommen; nach einer weiteren Woche wurde die Tumoresetzung durchgeführt, wie oben beschrieben (Fig. 6: gefüllte Dreiecke).

Es zeigte sich, daß diejenige Vakzine, die das Peptid mit Polylysin vereinigt enthielt, die Mäuse am besten vor Tumorbildung schützte.

## LITERATUR

- Alexander, J. et al., 1989, Immunogenetics 29, 380
- Allred, D.C. et al., 1992, J. Clin. Oncol. 10 (4), 599-605
- Behr, J.P., 1994, Bioconj-Chem., Sept-Oct, 5(5), 382-9
- Biologic Therapy of Cancer, Editors: DeVita, V.T.Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Verlag J.B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, London, Hagerstown
- Boon, T., 1993, Spektrum der Wissenschaft (Mai), 58-66
- Boon, T. et al., 1994, Annu. Rev. Immunol. 12, 337-65
- Carrel, S. and Johnson, J.P., 1993, Current Opinion in Oncology 5, 383-389
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, Falk, K. et al., 1991, Nature 351, 290-296
- Coulie, P.G. et al., 1992, Int. J. Cancer, 50, 289-297
- Cox, A.L. et al., 1994, Science 264, 5159, 716-9
- Current Protocols im Molecular Biology, 1995, Herausgeber: Ausubel F.M., et al., John Wiley & Sons, Inc.
- Dranoff, G. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3539-3543
- Dranoff, G. und Mulligan, R.C., 1995, Advances in Immunology 58, 417
- Falk, K. et al., 1991, Nature 351, 290-296
- Felgner, J.H. et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 2550-2561
- Fenton, R.G. et al., 1993, J. Natl. Cancer Inst. 85, 16, 1294-302
- Fidler, et al., 1975, Cancer Res. 35, 218-234
- Fisk, B. et al., 1995, J. Exp. Med. 1881, 2109-2117
- Flow Cytometry, Acad. Press, Methods in Cell Biology, 1989, Vol. 33, Herausgeber: Darzynkiewicz, Z. und Crissman, H.A.

- Gedde Dahl, T. et al., 1992, Hum Immunol. 33, 4, 266-74
- Guarini, A. et al., 1995, Cytokines and Molecular Therapy 1, 57-64
- Han, X.K. et al., 1995, PNAS 92, 9747-9751
- Handbuch: FACS Vantage <sup>TM</sup> User's Guide, April 1994, Becton Dickinson
- Handbuch: CELL Quest <sup>TM</sup> Software User's Guide, June 1994, Becton Dickinson
- Hérin M. et al., 1987, Int. J. Cancer, 39, 390
- Hock, H. et al., 1993, Cancer Research 53, 714-716
- Jung, S. et al., 1991, J. Exp. Med. 173, 1, 273-6
- Kawakami, Y. et al., 1995, The Journal of Immunol. 154, 3961-3968
- Kärre, K. et al., 1986, Nature 319, 20. Feb., 675
- Lehmann, J.M. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9891-9895
- Lethe, B. et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22, 2283-2288
- Loeffler, J.-P. et al., 1993, Methods Enzymol. 217, 599-618
- Mackiewicz, A. et al., 1995, Human Gene Therapy 6, 805-811
- Malnati, M.S. et al., 1995, Science 267, 1016-1018
- Mandelboim, O. et al., 1994, Nature 369, 5.May, 67-71
- Mandelboim, O. et al., 1995, Nature Medicine 1, 11, 1179-1183
- Morishita, R. et al., 1993, J. Clin. Invest. 91, 6, 2580-5
- Nabel, G.J. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11307-11311
- Oettgen, H.F. und Old, L.J., 1991, Biologic Therapy of Cancer, Editors: DeVita, V.T.Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Verlag J.B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, London, Hagerstown, 87-119
- Ostrand-Rosenberg, S., 1994, Current Opinion in Immunology 6, 722-727
- Pardoll, D.M., 1993, Immunology Today 14, 6, 310
- Practical Immunology, Editors: Leslie Hudson and Frank C. Hay, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne



- Peace, D.J. et al., 1991, J. Immunol. 146, 6, 2059-65
- Peoples, G.E. et al., 1994, J. Immunol. 152, 10, 4993-9
- Plautz, G.E. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
90, 4645-4649
- Rammensee, H.G. et al., 1993, Current Opinion in  
Immunology 5, 35-44
- Rammensee, H.G., 1995, Current Opinion in Immunology 7,  
85-96
- Remy, J.S. et al., 1994, Bioconjug-Chem., Nov-Dec,  
5(6), 647-54
- Rivoltini, L. et al., 1995, The Journal of Immunology  
154, 2257-2265
- Schmidt, W. et al., May 1995, Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA, 92, 4711-4714
- Skipper, J., and Stauss, H.J., 1993, J. Exp. Med. 177,  
5, 1493-8
- Slingluff, C.L. et al., 1994, Current Opinion in  
Immunology 6, 733-740
- Stein, D. et al., 1994, EMBO-Journal, 13, 6, 1331-40
- Sykulev, Y. et al., 1994, Immunity 1, 15-22
- Tibbets, L.M. et al., 1993, Cancer, Jan. 15., Vol.71,  
2, 315-321
- van der Bruggen, P. et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24,  
9, 2134-40 Issn: 0014-2980
- Van ~~pel~~, A. and Boon, T., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA 79, 4718-4722
- Wölfel, T. et al., 1994 a), Int. J. Cancer 57, 413-418
- Wölfel, T. et al., 1994 b), Eur. J. Immunol. 24,  
759-764
- Yoshino, I. et al., 1994 a), J. Immunol. 152, 5,  
2393-400
- Yoshino, I. et al., 1994 b), Cancer Res., 54, 13,  
3387-90
- Zatloukal, K. et al., 1993, Gene 135, 199-20
- Zatloukal, K. et al., 1995, J. Immun. 154, 3406-3419

## Patentansprüche

1. Tumorstovakzine für die Verabreichung an einem Patienten, dadurch gekennzeichnet, daß sie Tumorzellen enthält, die von sich aus von Tumorantigenen abgeleitete Peptide im HLA-Kontext präsentieren und von denen zumindest ein Teil mindestens einen MHC-I-Haplotyp des Patienten an der Zelloberfläche aufweist, und die mit einem oder mehreren Peptiden a) und/oder b) derart beladen wurden, daß die Tumorzellen im Kontext mit den Peptiden vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen, wobei die Peptide
  - a) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Vakzine gemeinsam ist, fungieren, und verschieden sind von Peptiden, die abgeleitet sind von Proteinen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden, oder
  - b) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Vakzine gemeinsam sind, fungieren, und abgeleitet sind von Tumorantigenen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden und in einer Konzentration auf den Tumorzellen der Vakzine vorliegen, die höher ist als die Konzentration eines Peptids, das von demselben Tumorantigen abgeleitet ist wie das auf den Tumorzellen des Patienten exprimierte.
2. Tumorstovakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie autologe Tumorzellen enthält.

3. Tumorstakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie allogene Tumorzellen enthält.
4. Tumorstakzine nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die allogenen Tumorzellen Zellen einer oder mehrerer Zelllinien sind, von denen zumindest eine Zelllinie mindestens ein, vorzugsweise mehrere Tumorstantigene exprimiert, die identisch sind mit den Tumorstantigenen des zu behandelnden Patienten.
5. Tumorstakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer Mischung von autologen und allogenen Zellen besteht.
6. Tumorstakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) oder b) ein H2-K<sup>d</sup>-Ligand ist.
7. Tumorstakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) oder b) ein H2-K<sup>b</sup>-Ligand ist.
8. Tumorstakzine nach Anspruch 1, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) von einem natürlich vorkommenden immunogenen Protein bzw. einem zellulären Abbauprodukt davon abgeleitet ist.
9. Tumorstakzine nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) von einem viralen Protein abgeleitet ist.
10. Tumorstakzine nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid von einem Influenzavirus-Protein abgeleitet ist.

11. Tumorstoffe nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid die Sequenz Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile aufweist.
12. Tumorstoffe nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid die Sequenz Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met aufweist.
13. Tumorstoffe nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) von einem bakteriellen Protein abgeleitet ist.
14. Tumorstoffe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) von einem patientenfremden Tumorstoffen abgeleitet ist.
15. Tumorstoffe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid a) ein synthetisches Peptid ist.
16. Tumorstoffe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid die Sequenz Phe Phe Ile Gly Ala Leu Glu Glu Ile aufweist.
17. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen mit mehreren Peptiden unterschiedlicher Sequenz behandelt wurden.
18. Tumorstoffe nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Peptide dadurch unterscheiden, daß sie an unterschiedliche HLA-Subtypen binden.
19. Tumorstoffe nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Peptide hinsichtlich ihrer nicht für die HLA-Bindung maßgeblichen Sequenz unterscheiden.

20. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie außerdem Tumorzellen enthält, die mit einem Zytokinen transfiziert sind.
21. Tumorstoffe nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Zytokin IL-2 und/oder IFN- $\gamma$  ist.
22. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie außerdem Fibroblasten enthält, die mit einem Peptid b) behandelt wurden.
23. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie außerdem dendritische Zellen enthält, die mit einem Peptid b) und/oder mit einem an ein MHC-II-Molekül bindenden Peptid behandelt wurden.
24. Verfahren zur Herstellung einer Tumorstoffe, enthaltend Tumorzellen, zur Verabreichung an einen Patienten, dadurch gekennzeichnet, daß man Tumorzellen, die von sich aus von Tumorantigenen abgeleitete Peptide im HLA-Kontext präsentieren und von denen zumindest ein Teil mindestens einen MHC-I-Haplotyp des Patienten exprimiert, mit einem oder mehreren Peptiden behandelt, die
  - a) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Stoffe gemeinsam sind, fungieren, und verschieden sind von Peptiden, die abgeleitet sind von Proteinen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden, oder die
  - b) als Liganden für den MHC-I-Haplotyp, der dem Patienten und den Tumorzellen der Stoffe gemeinsam sind, fungieren, und abgeleitet sind von

Tumorantigenen, die von Zellen des Patienten exprimiert werden,

wobei man die Tumorzellen mit einem oder mehreren Peptiden a) und/oder b) so lange und in einer solchen Menge in Gegenwart eines organischen Polykations inkubiert, bis die Peptide an die Tumorzellen derart gebunden sind, daß sie im Kontext mit den Tumorzellen vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man als Polykation Polylysin einsetzt.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß man Polylysin einer Kettenlänge von ca. 30 bis ca. 300 Lysinresten einsetzt.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß man das Polykation in zumindest teilweise konjugierter Form einsetzt.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation mit Transferrin konjugiert ist.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen außerdem in Gegenwart von DNA behandelt.
30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA ein Plasmid ist.
31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis DNA zu, gegebenenfalls teilweise mit einem Protein konjugiertem, Polykation ca. 1:2 bis ca. 1:5 beträgt.

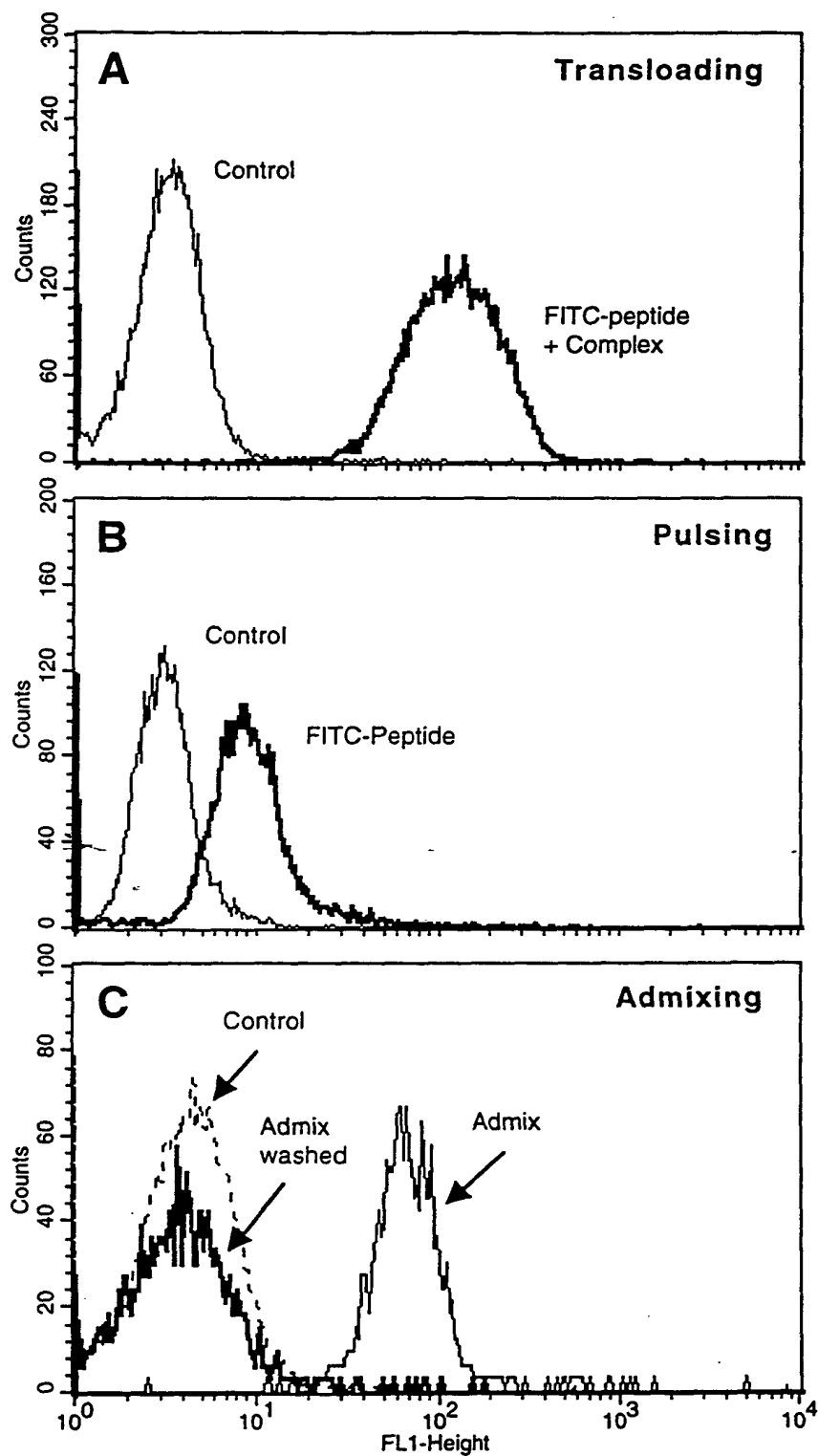
32. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man Peptid a) und/oder b) in einer Menge von ca. 50  $\mu\text{g}$  bis ca. 160  $\mu\text{g}$  pro  $1 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^7$  Zellen einsetzt.
33. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 24 bis 32 auf Fibroblasten, wobei man als Peptid ein von einem Tumorantigen des Patienten abgeleitetes Peptid b) einsetzt.
34. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 24 bis 32 auf dendritische Zellen, wobei man als Peptid ein von einem Tumorantigen des Patienten abgeleitetes Peptid b) und/oder ein Peptid einsetzt, das an ein MHC-II-Molekül des Patienten bindet.

### Zusammenfassung

Tumorstoffe und Verfahren zu deren Herstellung. Die Tumorstoffe enthalten Tumorzellen, von denen zumindest ein Teil mindestens einen MHC-I-Haplotyp des Patienten an der Zelloberfläche aufweist, und die mit einem oder mehreren Peptiden, die an das MHC-I-Molekül binden, derart beladen wurden, daß die Tumorzellen im Kontext mit den Peptiden vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen. Die Beladung wird in Gegenwart eines Polykations wie Polylysin vorgenommen.



Fig. 1



A

B

C

Fig. 1D



**Peptide 101 FITC pLys**



**Control**

Fig. 2A

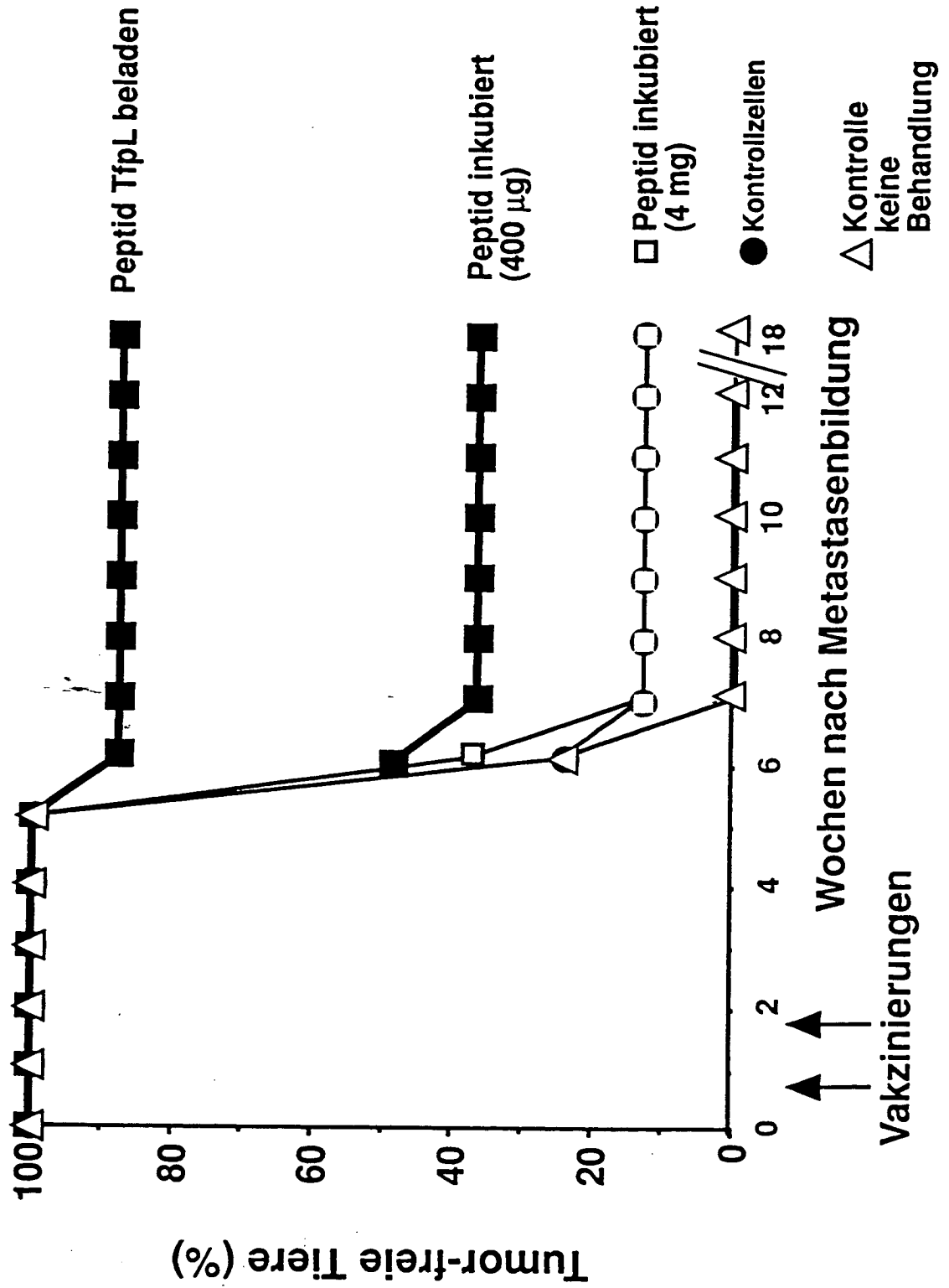


Fig. 2B

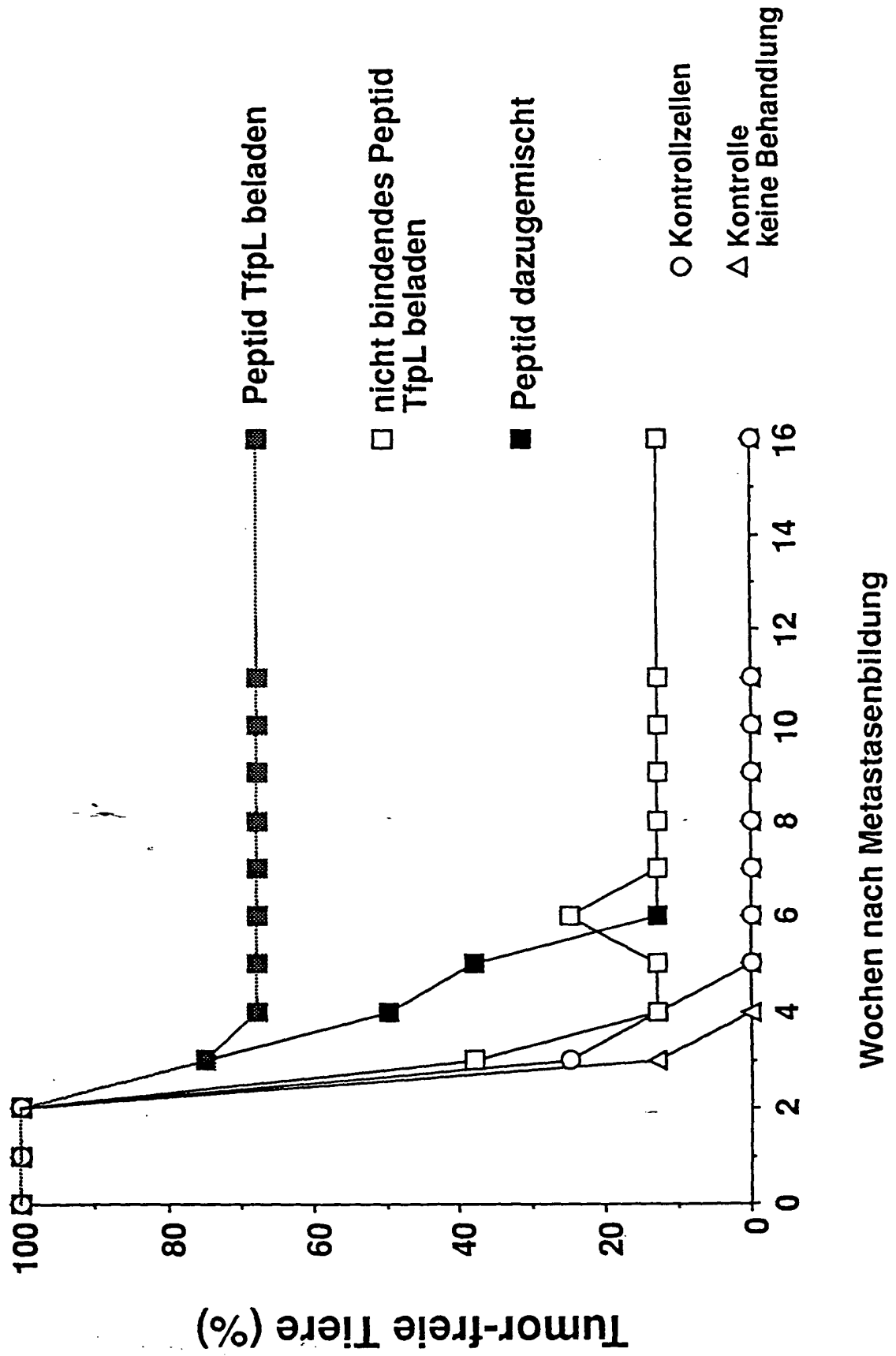


Fig. 3A

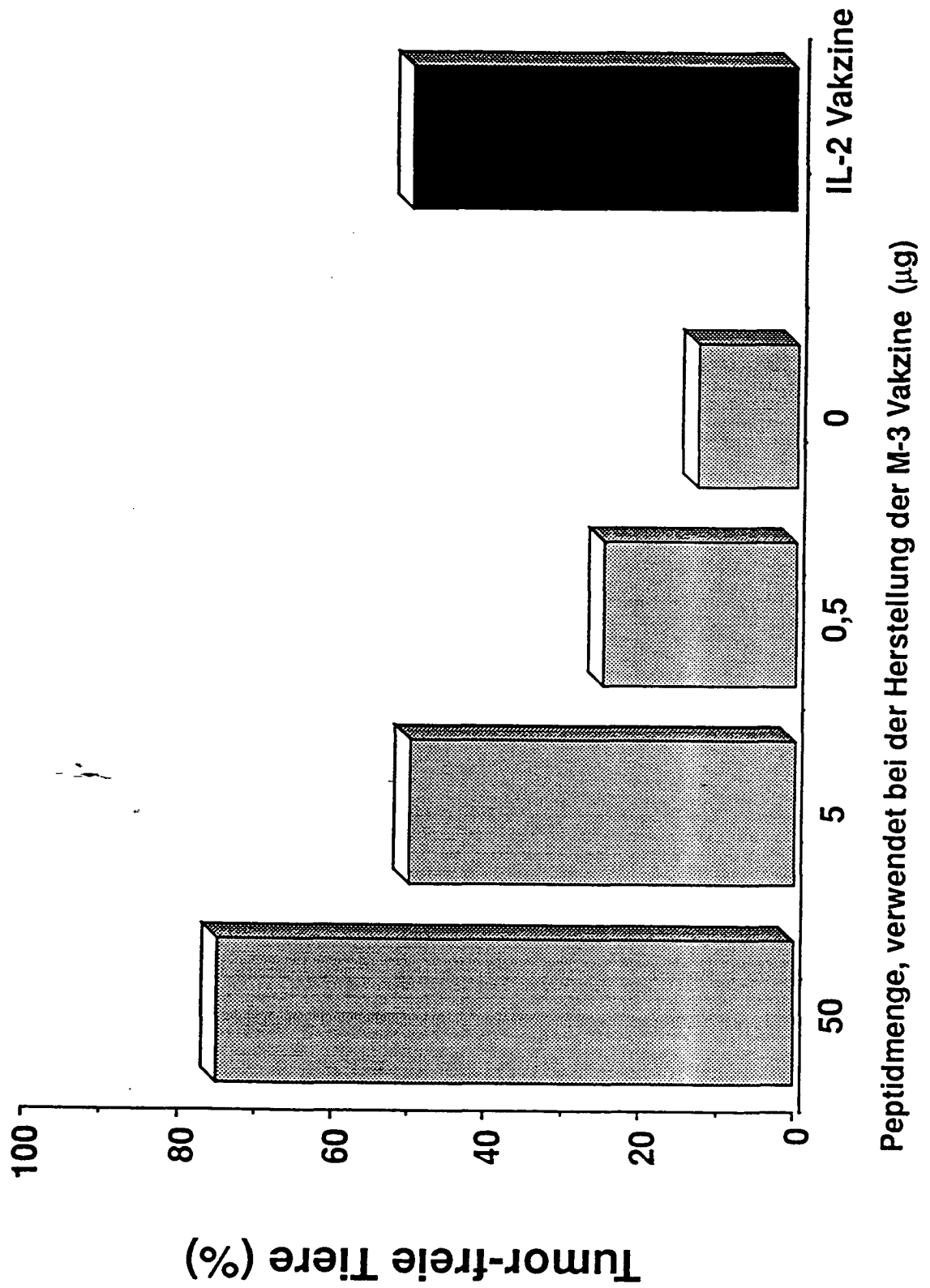


Fig. 3B

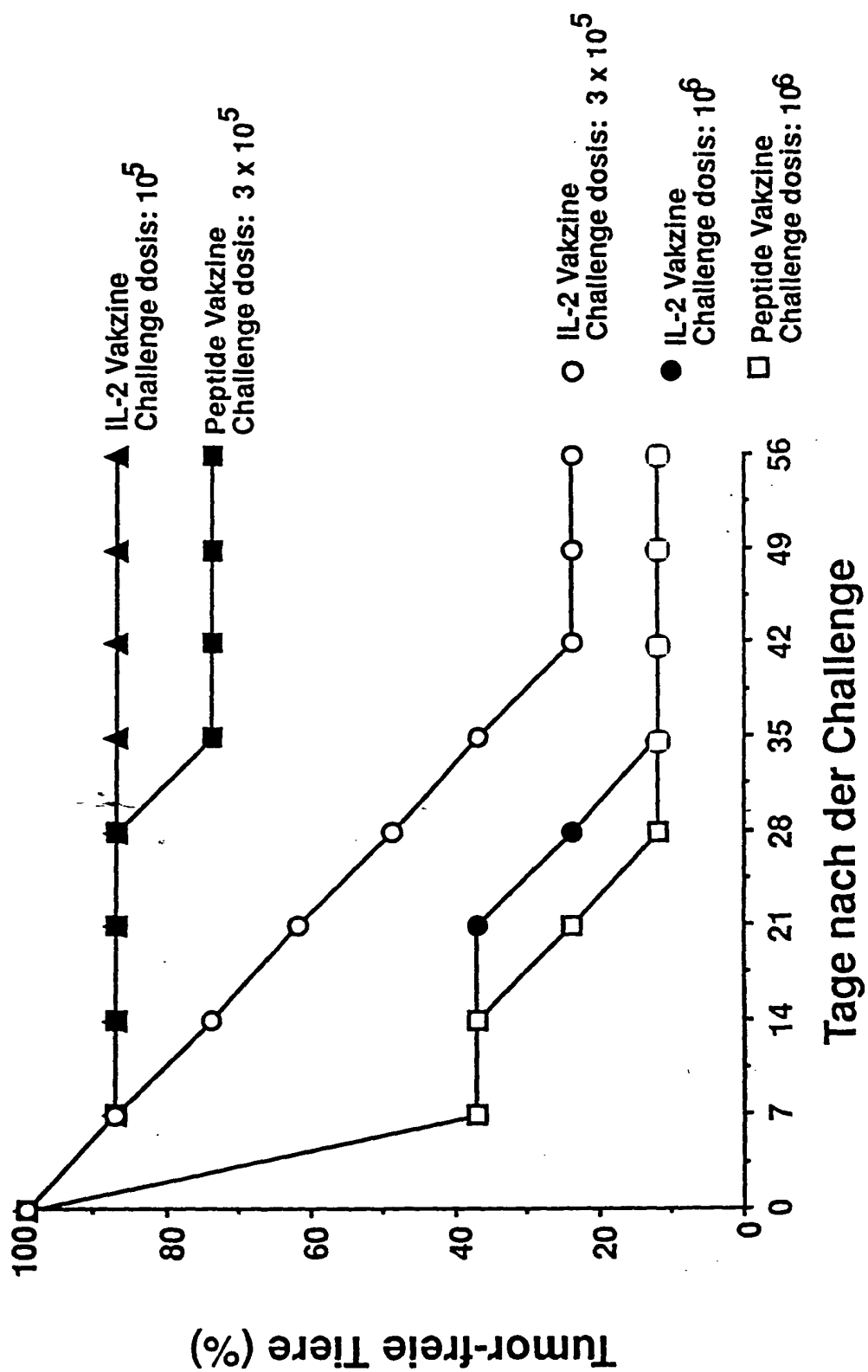


Fig. 4A

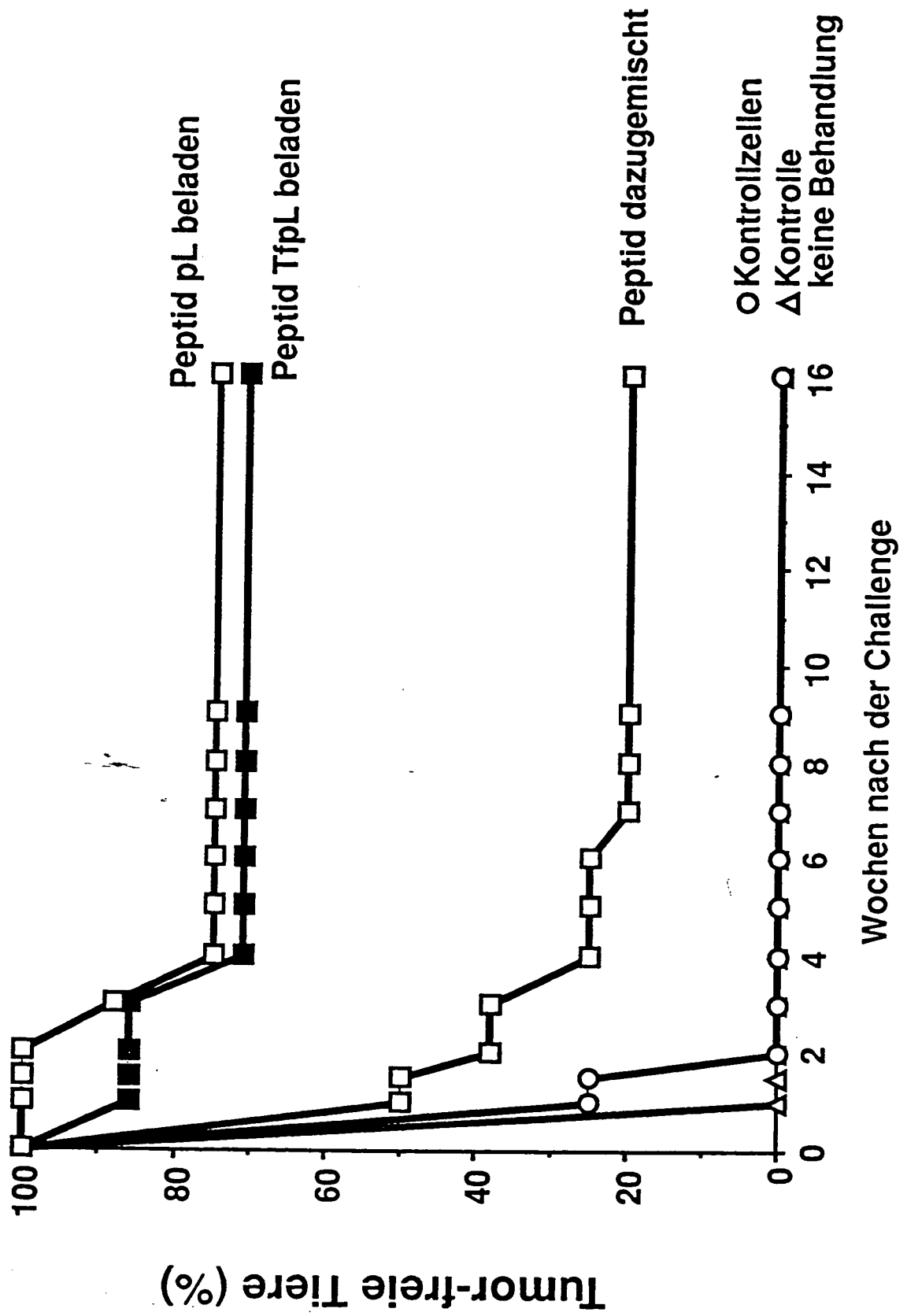


Fig. 4B

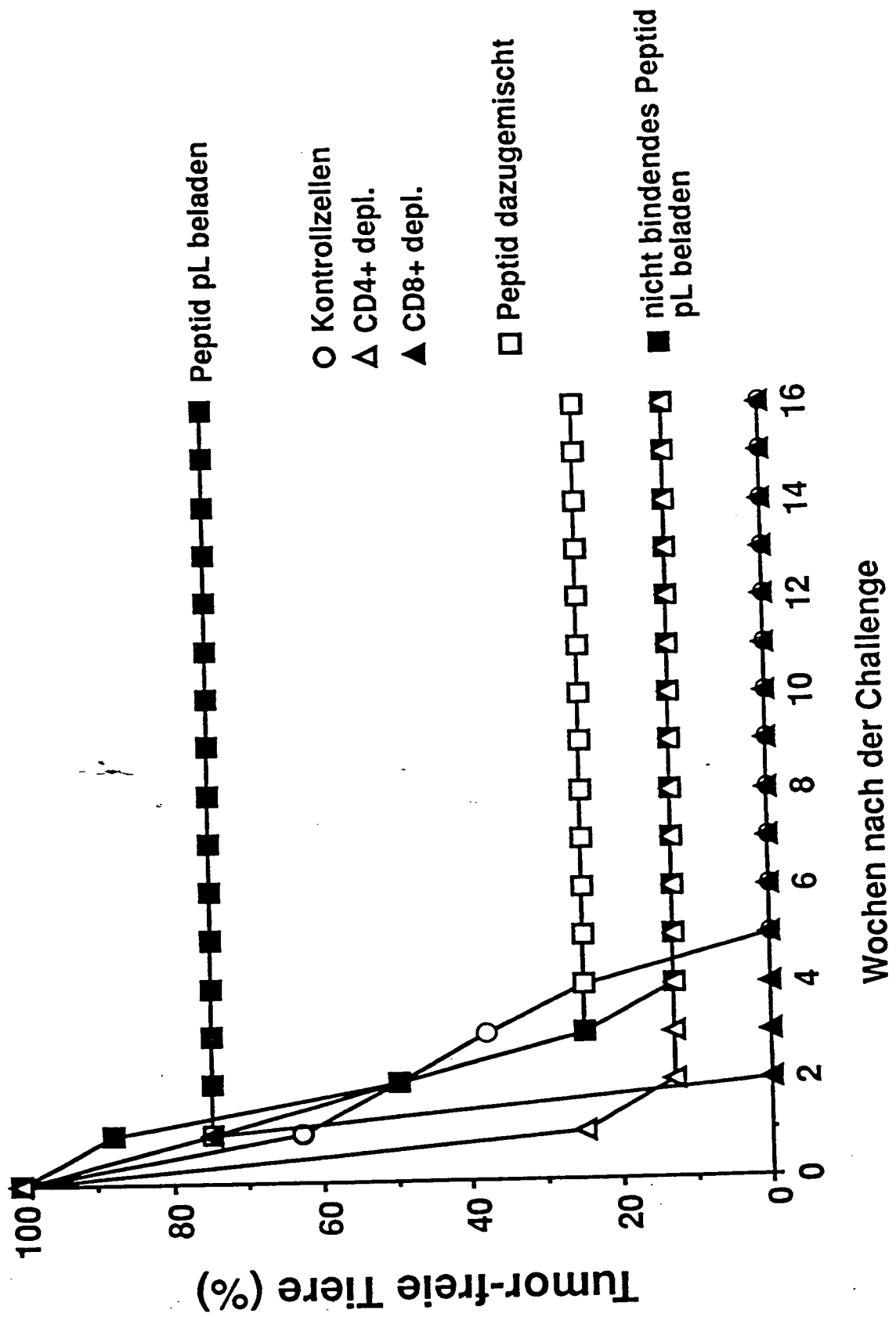




Fig.5

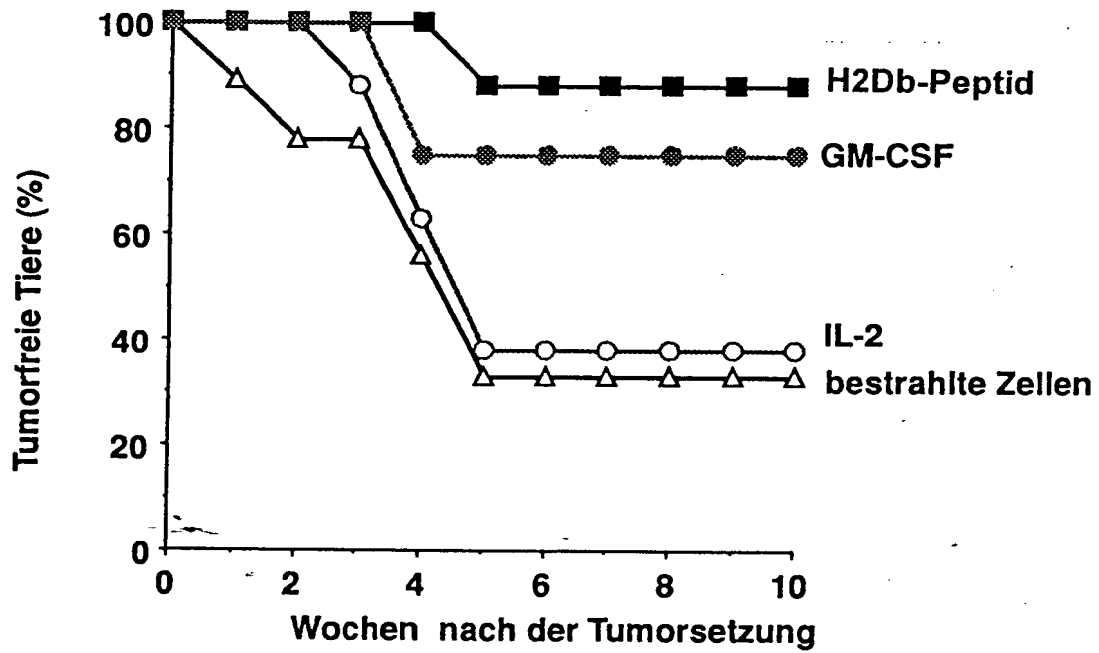


Fig. 6

